الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة دمشق – كلية العلوم
قسم علم الحياة النباتية

تحديد بعض خواص جراثيم الباسيلوس المعزولة من غوطة دمشق وتقييم إنتاجها للأميلاز

Determination of some properties of Bacillus isolated from Damascus Ghouta and evaluating their production of a-amylase

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في الأحياء الدقيقة

إعداد

ياسر كامل عقيد

(دبلوم دراسات عليا في الأحياء الدقيقة)

إشراف

الأستاذ الدكتور عدنان علي نظام

<u>لجنة الحكم</u>

الدكتور **عدنان علي نظام** أستاذ في كلية العلوم بجامعة دمشق عضواً ومشرفاً
الدكتور **شريف صادق** أستاذ في كلية الهندسة الكيميائية والبترولية بجامعة البعث عضواً
الدكتور **حسن الحمادي** أستاذ مساعد في كلية العلوم بجامعة حلب عضواً

دمشق في 03/02/ 2010

الجمهورية العربية السورية

وزارة التعليم العالي

جامعة دمشق – كلية العلوم

قسم علم الحياة النباتية

تحديد بعض خواص جراثيم الباسيلوس المعزولة من غوطة دمشق وتقييم إنتاجها للأميلاز

Determination of some properties of Bacillus isolated from Damascus Ghouta and evaluating their production of a-amylase

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في الأحياء الدقيقة

إعداد

ياسر كامل عقيد

(دبلوم دراسات عليا في الأحياء الدقيقة)

إشراف

الأستاذ الدكتور عدنان علي نظام

<u>لجنة الحكم</u>

الدكتور **عدنان علي نظام**	أستاذ في كلية العلوم بجامعة دمشق	عضواً ومشرفاً
الدكتور **شريف صادق**	أستاذ في كلية الهندسة الكيميائية والبترولية بجامعة البعث	عضواً
الدكتور **حسن الحمادي**	أستاذ مساعد في كلية العلوم بجامعة حلب	عضواً

(№: 7) دمشق 2010

جامعة دمشق – كلية العلوم

قسم علم الحياة النباتية

إقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة " تحديد بعض خواص جراثيم الباسيلوس المعزولة من غوطة دمشق وتقييم إنتاجها للأميلاز **Determination of some properties of *Bacillus* isolated from Damascus Ghouta and evaluating their production of α-amylase**" قد جرى بإشرافي في قسم علم الحياة النباتية من كلية العلوم بجامعة دمشق.

التوقيع :

المشرف العلمي : الدكتور عدنان علي نظام

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : 03 / 02 / 2010

إقرار الباحث

أشهد أن موضوع هذه الرسالة " تحديد بعض خواص جراثيم الباسيلوس المعزولة من غوطة دمشق وتقييم إنتاجها للأميلاز **Determination of some properties of *Bacillus* isolated from Damascus Ghouta and evaluating their production of α-amylase**" لم يسبق أن قبل لأية شهادة، ولا هو مقدم حالياً للحصول على أية شهادة أخرى.

التوقيع :

الباحث : ياسر كامل عقيد

التاريخ : 03 / 02 /2010

الإهداء

إلى من ربّياني صغيراً ورعياني كبيراً أبي وأمي

إلى من ساندتني حتى تم هذا العمل رفيقة دربي زوجتي

إلى زهرتي حياتي عمار ورغد

إلى من تجمعني معهم أمتن الصلات إخوتي الأعزاء

أهدي هذا العمل

ياسر

كلمة شكر

لا يسعني بعد توفيق الله في إتمام هذه الدراسة، فله الحمد والشكر أوّلاً و آخراً، إلا أن أتوجه بالشكر للأستاذ الدكتور عدنان علي نظام على تفضله بالإشراف على هذا البحث وإعطائي الكثير من وقته وجهده وتوجيهاته، فأرجو له دوام التوفيق والنجاح.

كما أتقدم بالشكر لكل من الأستاذ الدكتور شريف صادق والأستاذ الدكتور حسن الحمادي على تفضلهما بتحكيم هذه الرسالة وتوجيهاتهما لإخراجها بأفضل شكل.

كما لا يفوتني أن أتوجه بخالص الشكر لأساتذتي وزملائي في قسم علم الحياة النباتية ولكل من ساهم وساعد في إنجاز هذا العمل.

المحتوى

قائمة الأشكال

قائمة الجداول

الملخص

جمعت عيّنات من تربة غوطة دمشق من أربعة مواقع هي: داريّا ويلدا ودير العصافير والنّشّابية، وحددت نسبة الرطوبة والعدد العام للجراثيم وعدد جراثيم الباسيلوس ونسبتها في عينات التربة، وأظهرت النتائج أن نسبة الرطوبة تراوحت بين 20% في داريا و7% في النّشّابية، وتراوح العدد العام للجراثيم بين 3800×10^3 خلية بكل غرام تربة جاف في داريا و490×10^3 خ/غ تربة في النشابية، كما تراوحت أعداد الباسيلوس بين 1200×10^3 خ/غ تربة في داريا و310×10^3 خ/غ تربة في يلدا، وتراوحت نسبة عدد جراثيم الباسيلوس إلى العدد العام لجراثيم التربة بين 59% في النّشّابية و21% في دير العصافير.

وفي هذه الدراسة أمكن الحصول على 79 عزلة جرثومية نقية (رُمِّزت من B1 إلى B79)، وتبين أنها تنتمي إلى الجنس باسيلوس اعتماداً على طريقة العزل ونتائج دراسة الصفات العامة المميزة لهذا الجنس، مثل، شكل المستعمرات ولونها، وتلون الخلايا بصبغة غرام، وتفاعل الكاتلاز، والاحتياجات للأكسجين، وتوزعت العزلات بحسب المواقع كالآتي:

- 26 عزلة من داريّا (33% من العزلات).
- 23 عزلة من النّشّابية (29%).
- 18 عزلة من يلدا (23%).
- 12 عزلة من دير العصافير (15%).

وحفظت العزلات بطريقتين:

- الأولى على الآغار المغذي المائل في درجة الحرارة 4ْم.
- الثانية في الغليسيرول 15% في الدرجة – 20ْم.

وأجريت غربلة أولية للعزلات على أطباق آغار النشاء للتحري عن إنتاجها للألفا أميلاز وتحديد العزلات ذات الكفاءة العالية في إنتاج الألفا أميلاز، وأظهرت النتائج أنّه من بين 79 عزلة لجراثيم الباسيلوس كانت 62 عزلة منتجة للألفا أميلاز و17 عزلة غير منتجة له، وقد حددت كفاءة العزلات المنتجة للألفا أميلاز استناداً إلى النسبة بين قطر الهالة الشّفافة المتكونة حول المستعمرة ـ نتيجة تحلل النشاء بفعل الألفا أميلاز ـ وقطر المستعمرة ذاتها، حيث تراوحت كفاءتها بين 1 – 3.6.

واختيرت العزلات ذات الكفاءة العالية التي أعطت قيماً بين 2.7 – 3.6 لاستزراعها في الوسط السائل لإنتاج الإنزيم وتقييم إنتاجها كمّيّاً، وأظهرت نتائج معايرة الألفا أميلاز في المستخلص الإنزيمي أن العزلة B68 كانت الأفضل إنتاجاً بين العزلات الإحدى عشرة المختبرة في شروط التخمير السائل، حيث بلغت فعاليتها 8.5 وحدة/مل وفعاليتها النوعية 28 وحدة/ملغ بروتين.

وأجريت بعض الاختبارات لتحديد الخصائص الفيزيولوجية والحيوية الكيميائية لتشخيص العزلات الإحدى عشرة، وأمكن تحديد النوع لبعض هذه العزلات استناداً إلى مقارنة نتائج الاختبارات بدليل برجي 1986، حيث عرّفت العزلات B1، و B30، و B79 بأنها *B. subtilis*، والعزلتان B59، و B68 بأنهما *B. licheniformis*، والعزلة B24 بأنها *B. cogulans*، والعزلة B75 بأنها *B. firmus*.

كما درس تأثير الرقم الهيدروجيني pH ودرجة الحرارة في فعالية الألفا أميلاز، وبيّنت النتائج أن الفعالية الفضلى للألفا أميلاز كانت عند الرقم الهيدروجيني 6 ودرجة الحرارة 70ْم، ويمكن استعماله في التطبيقات الصناعية التي تتطلب المعاملة بدرجات حرارة عالية نسبيّاً ورقم هيدروجيني معتدل.

Summary

Soil samples came from cultivated and uncultivated fields in Damascus Ghouta including four areas: Dareyyah, Yelda, Deiralasafir

and Alnashabeyeh. The samples were collected from 2 to 20 cm below the surface.

The moisture of the soil samples, total count of bacteria, and *Bacillus* count were estimated as:

- The moisture was between 20% in Dareyya and 7% in Alnashabeyeh.
- The total count of bacteria was between $3800X10^3$ cfu/g dry soil in Dareyya and $490X10^3$ cfu/g in Alnashabeyeh.
- The *Bacillus* count was between $1200X10^3$ cfu/g in Dareyya and $310X10^3$ cfu/g in Yelda, and the percentage of *Bacillus*/ total count of bacteria was between 59% in Alnashabeyeh and 21% in Deiralasafir.

79 pure bacterial isolates were isolated and by the method of isolation, colonies shape and colour, Gram's stain, catalase test, and oxygen requirements, it was found that they belong to *Bacillus* genus. The isolates were:

- 26 isolates from Dareyyah (representing 33%).
- 23 isolates from Alnashabeyeh (representing 29%).
- 18 isolates from Yelda (representing 23%).
- 12 isolates from Deiralasafir (representing 23%).

The isolates were maintained by tow methods:

- On nutrient Agar slants at 4 °C.
- In 15% glycerol at -20 °C.

Bacillus isolates were screened for the α-amylase production on starch Agar plates. The results showed that 62 isolates were producers of α-amylase and 17 isolates weren't producers of it. The competence of the isolates that produced α-amylase was estimated by measuring the diameter of clear zone and growth zone (CZ/GZ);so that the competence was between 1 – 3.6.

Based on the competence, 11 isolates that showed the highest competence between 2.7 – 3.6, were selected for quantity screening in enzyme production liquid medium. After incubation, the fermentation medium was harvested by centrifugation at 4000 rpm for 15 min; the supernatant was collected and subjected to estimate the α-amylase activity and The results showed that B68 isolate was the best producer of α-amylase among the isolates that were tested in liquid fermentation conditions, where the activity of α-amylase, produced by B68 isolate, was 8.5 U/ml and its specific activity was 28 U/mg protein.

Some testes had been done to determine the physiological and biochemical characterisations of the 11 isolates and based on Bergey's manual of systematic bacteriology 1986, the isolates were specified as:

- B1, B30, and B79 *B. subtilis*.
- B59, B68 *B. licheniformis*.
- B24 *B. cogulans*.
- B75 *B. firmus*.

The effect of pH and temperature on α-amylase activity were determined, and the results showed that the optimum pH was 6 and the optimum temperature was 70 °C. For that α-amylase produced by B68 (*B. licheniformis*) can be used in industrial applications which acquire treatment at high temperature and moderate pH.

Syrian Arab republic
Damascus University
Faculty of sciences
Plant Biology Department

Determination of some properties of Bacillus isolated from Damascus Ghouta and evaluating their production of a-amylase

M Sc Thesis
Presented by

Yasser Akeed
(Diploma in Microbiology)

Suppervisor

Prof. Dr. Adnan Ali Nizam

Judgment staff
Prof. Dr. **Adnan Ali Nizam** Faculty of Science, Damascus University.
Prof. Dr. **Sharif Sadek** Faculty of chemical and Petroleum, Engineering , Albaath University .
Associate Prof. **Hasan Alhammadi** Faculty of Science, Aleppo University.

Damascus, February 2010

مقدمة Introduction

يمكن عزل أنواع كثيرة من الأحياء الدقيقة من التربة حيث تتوافر الخلايا الإعاشية vegetative cellsللعديد من أجناس الجراثيم والفطريات في التربة الخصبة الرطبة ويكون كثير من العناصر المغذية متاحاً، ولذلك فإن الجراثيم، مثل: *Micrococcus*، *Pseudomonas*، *Streptomyces*، *Lactic acid bacteria*، *Clostridium*، *Coliforms*، *Bacillus*، تتمكن من استقلاب المواد الحيوانية والنباتية المتحللة وأنواع مختلفة من المركبات اللاعضوية، كما تكون الفطريات فعالة في مثل هذه البيئات، و عندما تُستنزف العناصر المغذية أو تصبح غير متاحة بسبب الجفاف فإن الخلايا الإعاشية لبعض الأحياء، مثل: *Streptomyces*، Moldsتكوّن أبواغاً تكاثرية reproductive spores مقاومة للجفاف يمكن أن تُحمل بوساطة الرياح وتيارات المياه إلى موائل جديدة. كما تُنتج الخلايا الإعاشية لأحياء أخرى ولاسيما *Bacillus* و *Clostridium* أبواغاً داخلية Endospores يمكنها أن تقاوم مختلف الظروف البيئية القاسية كالأشعةو الحرارة الشديدةو البرد الشديد و شح الغذاء والماء، وتنتش في الظروف الملائمة للنمو [Virtual microbiology 2008].

ومن أهم الخصائص المفتاحية التي تميز الجراثيم الهوائية أو اللاهوائية اختيارياً التي تنتمي إلى الجنس باسيلوس *Bacillus* هي مقدرتها على تكوين أبواغٍ داخلية ذات مقاومة عالية للحرارة والجفاف والأشعة فوق البنفسجية، ويمكن لهذه الأبواغ أن تبقى هاجعة عدة سنوات في البيئة، وعندما تأتي الظروف البيئية الملائمة للنمو تنتش الأبواغ معطيةً خلايا إعاشية تواصل النمو لإعطاء خلية شبيهة بالخلية الأصل.ولمّا كانت الأبواغ الداخلية تتميز بخاصة المقاومة للحرارة، وفي الوقت نفسه ينشط إنتاشها بالحرارة، فإن تعريض عينة التربة لصدمة حرارية Heat shock يؤدي إلى قتل جميع الجراثيم وتحفيز أبواغ الباسيلوس *Bacillus* على الإنتاش عند حضنها في الحرارة الملائمة لتكوين مستعمرات على أطباق الآغار المغذي [Teresa Thiel 1999].

تتّصف جراثيم الباسيلوس بقدرةكبير ة على الانتشار في الطبيعة حتى في البيئات القاسية، لأنها تمتلكتنوعاً واسعاً في الوظيفة و القدرة على تفكيك معظم المواد النباتية والحيوانية، ويضم الجنس باسيلوس عدداً من الأنواع ذات الأهمية البيئية و التطبيقية الكبيرة، حيث ينتمي إليها معظم الجراثيم المنتجة للإنزيمات التجارية [زهران وبريشة 2006، Claus & Berkeley 1986].

إن قدرة الأحياء الدقيقة على إنتاج مواد ذات أهمية تطبيقية كالإنزيمات والصادات الحيوية والحموض الأمينية وغيرها من المركبات مازالت تجذب اهتمام العديد من الباحثين لعزل واكتشاف سلالات مختلفة من هذه الأحياء تتمتع بكفاءة عالية في إنتاج الإنزيمات واستعمالها في العديد من المجالات، وقد شهدت العقود الثلاثة الأخيرة من القرن الماضي تطوراً ملحوظاً في إنتاج الإنزيمات ولاسيما من الأحياء

الدقيقة، وبالرغم من محدودية الأحياء الدقيقة المستعملة في الإنتاج الصناعي للإنزيماتفإن التوجّه يزداد يوماً بعد آخر في استثمار التطورات الهائلة التي تشهدها مجالات التقانات الحيوية لإنتاج إنزيمات بمواصفات وكميات تلبّي احتياجات السوق العالمية من هذه الإنزيمات، وقد كان إنزيم الأميلاز Amylase أول الإنزيمات المنتجة صناعياً من مصدر فطري في العام 1894 على يد الباحث الياباني تاكمين Takamin حيث استُعمل الإنزيم في معالجة صيدلانية للاضطرابات الهضمية [Crueger & Crueger1989, Ashie 2003].

وتكتسب إنزيمات الأميلاز أهمية كبيرة في التطبيقات الصناعية، فمن بين إنزيمات الأميلاز يمتلك الألفا–أميلاز النصيب الأكبر في سوق تجارة الإنزيمات وفي التطبيقات الأهم في الصناعة النشوية Starch industry، مثل: صناعة الخبز Baking، والصناعات الكيميائية التحليلية Analytical chemistry، وصناعة المنظفات المستعملة في الجلايات الآلية Automatic dishwashing detergents، والصناعة النسيجية Textile desizing، وصناعة الورق وعجينة الورق Pulp and paper industry [Gupta et al., 2003].

يوجد إنزيم ألفا–أميلاز بدرجة كبيرة في الأحياء الدقيقة، حيث ذكرت مراجع عديدة منذ عام 1967 حتى الآن 39 سلالة منتجة تجارياً ، منها 9 سلالات تنتمي إلى جراثيم الجنس *Bacillus*، ويُستعمل حالياً عدد من سلالات الجنس *Bacillus* لإنتاج إنزيم ألفا–أميلاز α-Amylase بشكل تجاري [زهران وبريشة 2006].

وبناء عليه، يمكن النظر إلى جراثيم الباسيلوس المعزولة من البيئة المحلية على أنها ثروة كبيرة تستحق البحث والدراسة للاستفادة منها في تطبيقات كثيرة، حيث يزداد التوجه اليوم لاستعمال الأحياء الدقيقة ومنتجاتها لما لها من ميزات وفوائد، في حقبة تنامي الاتجاهات في حقل التقانات الحيوية، ويأتي في الدرجة الأولى إنتاج إنزيمات الحلمهة Hydrolases.

أهداف البحث Research aims

نظراً إلى الأهمية الكبيرة التي تتمتع بها جراثيم الجنس *Bacillus*في كثير من المجالات و لاسيما في إنتاج إنزيمات الأميلاز ذات التطبيق الواسع في كثير من الصناعات، وفي مقدمتها الصناعات الغذائية، وتوجه عدد من الأبحاث العالمية إلى عزل ودراسة أفراد هذا الجنس من بيئاتها المحلية واستعمالها في تطبيقات عديدة، من بينها إنتاج الإنزيمات، فإن هذه الدراسة تهدف إلى تحقيق الآتي:

1. الحصول على عزلات جرثومية للجنس *Bacillus* من مواقع متباينة من التربة في غوطة دمشق.
2. تنقية العزلات التي أمكن الحصول عليها وحفظها للتطبيقات اللاحقة.
3التحر ّي عن عزلات الباسيلوس *Bacillus* المنتجة لإنزيم ألفا–أميلاز α-Amylase، وتحديد العزلات ذات الكفاءة العالية.
4. دراسة بعض الخصائص الحيوية الكيميائية للعزلات ذات الكفاءة العالية في إنتاج الإنزيم، وتقدير إنتاجها للإنزيم في وسط سائل، وتحديد بعض الظروف الفضلى لعمل الإنزيم.

الفصل الأول

خصائص الباسيلوس وأهميتها التطبيقية

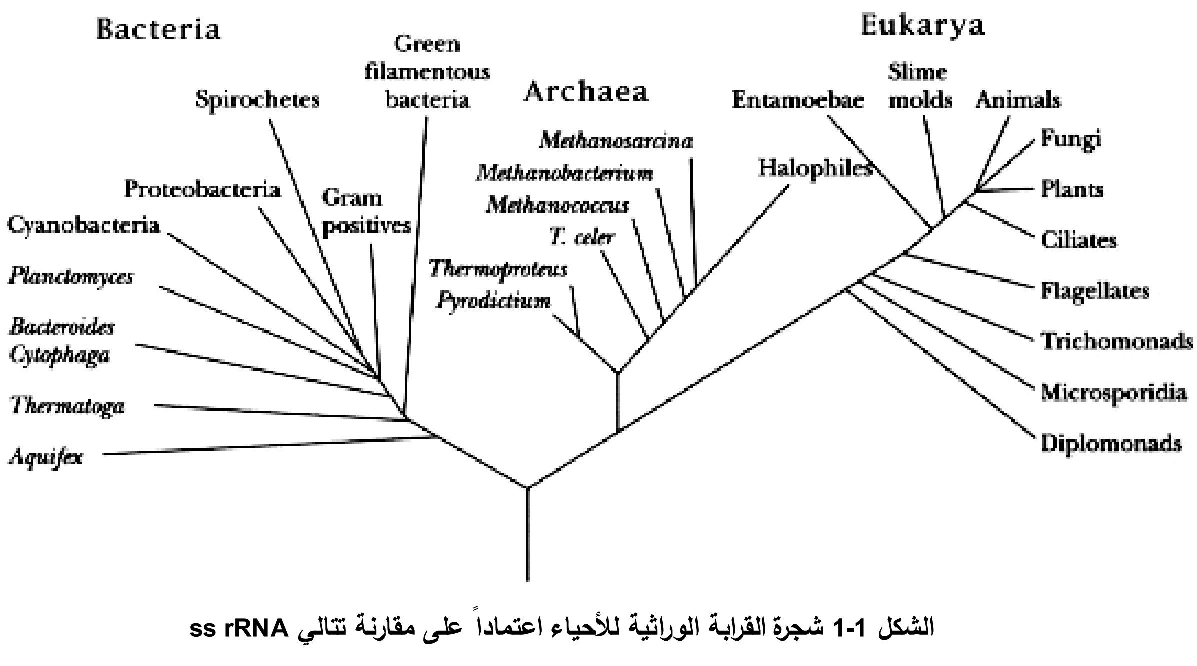
Characterization and application importance of *Bacillus*

(الدراسة المرجعية Review Study)

أولاً . الأحياء الدقيقة Microorganisms

تقسم الأحياء الدقيقة إلى خمس مجموعات تصنيفية هي: الطحالب Algae، والجراثيم Bacteria، والفطريات Fungi، والأوليات Protists، والفيروسات Viruses [Prescott et al. 1996; Hurst 2002].

وبالرغم من أن بدائيات النواة لا تملك تنوعاً بنيوياً إلا أنها تملك مدىً واسعاً من التنوع الوراثي والوظيفي. توحّد وتميّز صفات فيزيولوجية خاصة أحياناً مجموعات مستقلة من بدائيات النواة عند علماء الأحياء الدقيقة. وقد صُنّفت المجموعات المعرّفة من بدائيات النواة في دليل برجي Bergey's 1994 Manual of Determinative Bacteriology بالاعتماد على خصائص شكلية سهلة الملاحظة، مثل: صبغة غرام، والشكل (عصيّات، مكورات، الخ.)، والحركة، وخصائص بنيوية (الأبواغ، والسياط، والغلف Sheaths، والملحقات Appendages، الخ.) وخصائص وظيفية مميزة (التركيب الضوئي، والتنامي لاهوائياً، الخ.). أما حالياً، فقد عدل عن هذا النمط من نظم التصنيف إلى نظم تعتمد على تحاليل مورثية تقارن تتالي نكليوتيدات RNA الريبوزومي لتحت الوحدة الصغيرة الموجود في كل المتعضيات الخلوية. ويسود الاعتماد على النمط المورثي في النظم التصنيفية في الطبعة الثانية من دليل برجي Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001-2004) وكذلك الطبعة الثالثة من Prokaryotes. ونتيجة لذلك فإن شجرة الأنماط المورثية للأحياء وزّعت بدائيات النواة في قسمين رئيسين هما الجراثيم Bacteria والجراثيم القديمة Archaea (الشكل 1-1).



الشكل 1-1 شجرة القرابة الوراثية للأحياء اعتماداً على مقارنة تتالي ss rRNA

The Phylogenetic Tree of Life based on Comparative ss rRNA Sequencing

يلاحظ من هذه الشجرة التصنيفية أن المجموعات المهمة من بدائيات النواة قد وضعت تحت عناوين مصطنعة اعتماداً على خصائص عامة هي: البنية Structural والخصائص الحيوية الكيميائية Biochemical أو الخصائص الوظيفية البيئية Ecophysiological [Kenneth Todar 2009].

توجد الأحياء الدقيقة غالباً في جميع البيئات على الأرض، وربما تكون موجودة في غير هذا الكوكب أيضاً، ويمكن القول بكل قوة أنه حيثما وجد الماء السائل ووجدت مصادر الكربون والطاقة فإن الأحياء الدقيقة يمكن أن تكون موجودة، فمن الممكن أن تنمو الأحياء الدقيقة في درجات حرارة من تحت الصفر< 0 ْم (طحلب الثلج، و *Chlamydomas nivalis*) إلى 113 ْم (*Pyrolobus fumarii*) إلا أن معظم الأحياء الدقيقة تنمو في درجة حرارة بين 25 – 50 ْم، وكذلك يمكن أن توجد في البرك الملحية، ومياه الصرف الحمضية التي يبلغ رقمها الهدروجيني 1، وفي البيئات الخالية من الأكسجين، والتربة، وجسم الإنسان. وفي حال حساب أعداد الأحياء الدقيقة أو كتلتها الحيوية يبدو أنها الأشكال الأكثر شيوعاً بين الأحياء في جميع البيئات، فمثلاً يحتوي المسلك الهضمي عند الإنسان على عدد من الأحياء الدقيقة (نحو 100 تريليون) أي أكثر من عدد خلا يا جسم الإنسان (نحو 10 تريليون). وكذلك تعجُّ التربة بالأحياء الدقيقة حيث توجد مصادر غنية بالغذاء (أوراق وأغصان ميتة تكسو سطح التربة، وحيوانات ونباتات ميتة، ومخلفات عضوية). تمتلك الأحياء الدقيقة أدواراً مؤثرة بشكل كبير في البيئات التي تنمو فيها، فهي تستهلك المغذيات المتاحة لتوليد الطاقة وبناء الخلية، وبالتالي تفكك المخلفات، وتستفيد من هذه القدرة على الاستقلاب لتنمو بأعداد كبيرة. لا توجد الجراثيم في الطبيعة على نحو منعزل، فمحيطها الحيوي مزدحم بأنماط مختلفة عديدة من الأحياء الدقيقة تتنافس من أجل الغذاء والماء [Virtual microbiology 2008].

ثانياً . الأحياء الدقيقة في التربة Microorganisms in soil

ظهرت ميكروبيولوجيا التربة كعلم متميز في العام 1838 إذ تبيّن أن البقوليات يمكن أن تحصل على النتروجين من الهواء عندنمو في تربة لم تعرّض للحرارة، وبعد مضي خمسين عاماً تمكن العالم الألماني Boussingault من عزل الجراثيم من عقد جذور البقوليات. منذ ذلك الوقت ازداد عدد الدارسين المهتمين بهذا الحقل من العلم (ميكروبيولوجيا التربة)، ولا يزال العلماء مستمرين بدراسة تنوع الأحياء الدقيقة في التربة [Bhoopander Giri et al. 2005].

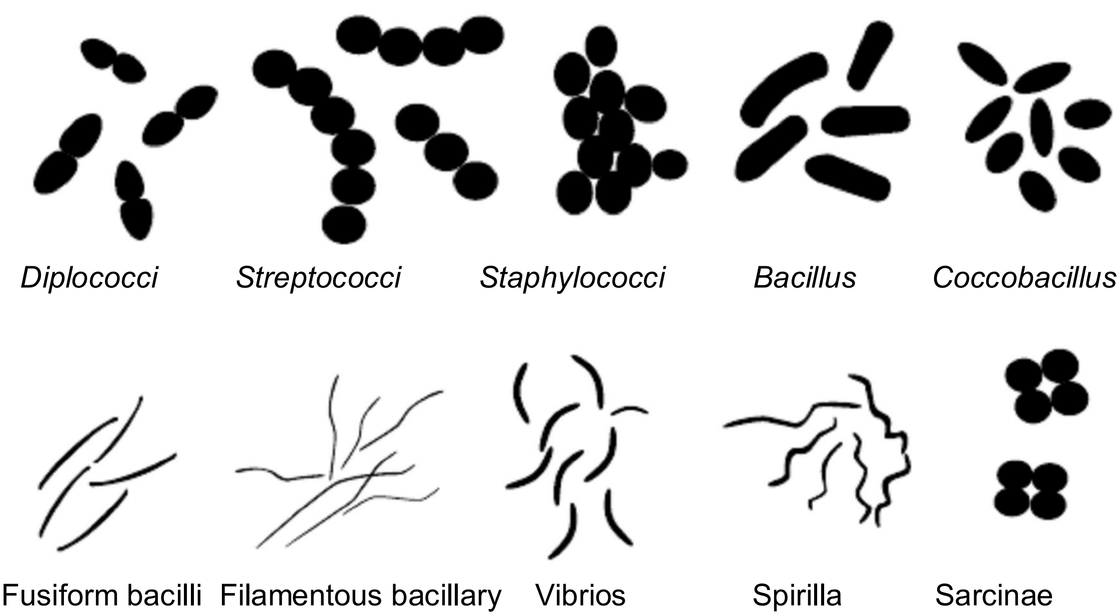
تعرّف التربة بأنها الغطاء الخارجي لسطح الأرض الذي يتكوّن من طبقات مرتّبة بشكل مخلخل Loosely وتتألّف من مركبات لاعضوية وعضوية في أطوار مختلفة من التعضي Organization [Tate 1995, Kapoor et al. 2002].

تعدّ التربة وسطاً طبيعياً تعيش فيه الأحياء الدقيقة وتنمو وتموت، وتحتوي تنوعاً واسعاً من الأحياء الدقيقة [Paul and Clark 1989]، وأُجري تقدير للجراثيم الحقيقية Eubacteria لأنها المجموعة الأكثر سيادة بين الأحياء الدقيقة في مختلف أنواع الترب (الجدول 1-1) Liesack and Stackebrandt 1992, Visscher et al.1992, [Borneman et al. 1996.

الجدول 1-1 تنوع الأحياء الدقيقة من المجموعات الرئيسة في التربة.

المجموعات الرئيسة Major groups	عدد أنواع الأحياء الدقيقة Number of microbial species			الأنواع في المزرعة Species in culture	
	الأنواع المعرّفة	الأنواع المتوقعة	الأنواع جميعاً %	العدد	جميع الأنواع المتوقعة (%)
الجراثيم	3,000	30,000	10	2,300	7
الفطريات	69,000	1,500,000	5	11,500	0.8
الطحالب	40,000	60,000	67	1,600	2.5

تمتلك الجراثيم التي تعيش في التربة أشكالاً مختلفة: المكورات Cocci 0.5 ميكروناً (مكم)، والعصيات Bacilli 0.3 – 0.5 مكم، والحلزونية Spiral (الشكل 1-2)، والجراثيم العصوية شائعة في التربة [Baudoin et al. 2001, 2002].



الشكل 1-2 تنوع الأشكال الرئيسة لجراثيم التربة Diversity of major forms of soil bacteria

يتّصف عمق التربة بأهمية بالغة في توزع الجراثيم حيث يترك تأثيره الكبير في حياة الجراثيم، ففي المناطق المعتدلة تنتشر الأحياء الدقيقة حتى عمق متر داخل التربة، ولكن كثافتها تتركز في السنتيمترات الأولى من السطح، ويقلّ العدد على سطح الترب الزراعية بسبب نقص الرطوبة، وكذلك بسبب التأثير القاتل المحتمل لأشعة الشمس، وتتوزع غزارة الجراثيم في طول قطاع التربة حتى آخر آفاقه، فهي تزداد في العمق حتى بضعة سنتيمترات ثم تأخذ الأعداد في التناقص مع ازدياد العمق (الجدول 1-2) [حمد 2005؛ Duineveld et al. 2001, Wieland et al. 2001].

الجدول 1-2: توزع الأحياء الدقيقة في الطبقات المختلفة من قطاع يمثل الترب اللاعضوية [حمد 2005]

العمق (سم)	أعداد الأحياء الدقيقة / غرام تربة × 10^3				
	الجراثيم		الشعاعيات	الفطريات	الطحالب
	الهوائية	اللاهوائية			
3 - 8	7800	1950	2080	119	25
20 - 25	1800	379	245	50	5
35 - 40	472	98	49	14	0.5
65 - 75	10	1	5	6	0.1
135 - 145	1	0.4	-	3	-

تتميز الترب الزراعية بوفرة أعداد الجراثيم في الطبقة التالية مباشرة للقشرة السطحية، أما ترب الغابات والحدائق والمراعي فإن أعلى غزارة تكون في الطبقة السطحية على مسافة 1 – 2 سم بسبب وفرة الظل، بينما لا يحدث تناقص في عدد الجراثيم مع ازدياد العمق في الترب العضوية عادة؛ وقد تكون الغزارة الأعلى أحياناً على عمق 160 سم من سطح التربة وإن معظم التغيرات التي تحدث في عدد الجراثيم في طبقات التربة المختلفة يمكن أن تعود إلى التباين في المواد العضوية المتاحة للأحياء الدقيقة وفي تركيز الأكسجين، كما ترجع بدرجة أقل إلى التغير في محتوى الرطوبة وتفاعل الوسط في التربة، وإلى مستوى العناصر الغذائية اللاعضوية، كما يمكن أن يكون لنسبة تركيز ثنائي أكسيد الكربون بعض التأثير في هذا المجال (الجدول 1-3)، وقد ساعدت الفحوصات التي أجريت لمختلف عينات التربة على حصر الأنواع التي تكوّن مجموعات على أوساط الآغار المغذية، حيث وجد أن 67% من المجموعات الجرثومية تمثل الجنس *Bacillus* [حمد 2005].

الجدول 1-3المجموعات الشكلية للجراثيم في تربتين مختلفتين (علماً أن أنواعاً كثيرة من جراثيم التربة تتميز بظاهرة التعدد الشكلي خلال مراحل النمو مثل الأنواع التي تنتمي إلى الجنس *Bacillus*).

أقسام الجراثيم		النسبة المئوية للعزلات الإجمالية	
		تربة حديقة	تربة زراعية
عصوية غير متبوغة	سالبة بصبغة غرام	58 –34	48 – 38
	موجبة بصبغة غرام	14 – 6	12 – 4
عصوية متبوغة		30 – 20	36 – 24
غير منتظمة الشكل		82 – 62	92 – 72
شعاعيات (أكتينوميسيت)		64 – 24	50 – 22

ثالثاً . توصيف الجنس *Bacillus* characterization

1. نبذة تاريخية Historical brief

يعد الجنس *Bacillus* من أقدم الأجناس الجرثومية المعروفة الذي يتميز بدور مهم في تطور علم الأحياء الدقيقة، وقد سجل كون Ferdinand Cohn (الذي كان معاصراً لكوخ Robert Koch) أول إشارة إلى هذا الجنس في عام 1872، حيث عمل على تسميةجر اثيم النوع *Bacillus subtillis* وتعريفها بأنها إيجابية بصبغة غرامقادرة على النمو بوجود الأكسجين وتشكل نمطاً فريداً لخلية هاجعة تدعى البوغة الداخلية Endospore، وكانت نموذجاً لجنس كبير ومتنوع من الجراثيم دعي لاحقاً الجنس باسيلوس *Bacillus* [Colin 1989, Kenneth Todar 2009].

2. الخصائص Features

إن الصفة التي تجمع هذه الجراثيم (أي الجراثيم المكو ّنة للأبواغ الهوائية أو اللاهوائية لختيارياً الموجبة بصبغة غرام Gram-positive aerobic or facultative endospore-forming bacteria) هي أنها: إيجابية بصبغة غرام،متبو ّغة، تنمو بوجود الأكسجين.

الخلايا عصوية الشكل، مستقيمة أو شبه مستقيمة، منتجة للأبواغ الداخلية التي تكون مقاومة للكثير من الظروف القاسية، وتبقى حية فترة طويلة، وتتكون بوغة واحدة في الخلية، إيجابية بصبغة غرام، أو إيجابية فقط في المراحل المبكرة من النمو، أو سلبية، هوائية إجبارية obligate aerobe أو هوائية اختيارية facultative aerobes، معظم السلالات منتجة للكاتالاز، إيجابية أو سلبية الأوكسيداز. يمكن أن تصادف الخلية العصوية مفردة أو ضمن سلاسل ربما تكون طويلة جداً، أو أن تمتلك نهايات مدورة أو مربعة، صغيرة (0.5 × 1.2ميكرومتراً) أو كبيرة (2.5 × 10 ميكرومتراً).

وتعدّ شكليّة **البوغة** (الخلية البوغية sporangium) صفة مميزة لأنواع *Bacillus*، وتكون الأبواغ الداخلية عادة بشكل أسطواني أو مجسم قطع ناقص أو بيضوي أو كروي، لكن سلالات بعض الأنواع تكوّن أيضاً أبواغاً داخلية بشكل الموزة أو الكلية، أما توضع البوغة ضمن الخلية البوغية فيمكن أن يكون مركزياً أو قرب مركزي أو تحت طرفي أو طرفياً أو جانبياً، والخلية الأم يمكن ألا تغير شكلها أو قد تنتفخ (فتكون مغزلية أو بشكل مضرب التنس) خلال تشكل الأبواغ الداخلية [Claus & Berkeley 1986، حمد وعلي نظام 1998]. وقد رتّب غوردن ومعاونوه Gordon et al.1973 السلالات التي درسوها في ثلاث مجموعات تبعاً لشكل البوغة وانتفاخ الخلية، وفق الآتي:

- الأبواغ في المجموعة الأولى ذات شكل قطع ناقص (إهليلجية) لا تسبب انتفاخ الخلية.
- الأبواغ في المجموعة الثانية ذات شكل قطع ناقص (إهليلجية) تسبب انتفاخ الخلية.
- أما في المجموعة الثالثة فالأبواغ كروية مع خلايا بوغية منتفخة.

تتمكّن الأبواغ الداخلية الناضجة من التحرر من الخلية نتيجة التحلل، وربما يمتلك غلاف البوغة أهمية تصنيفية، كما يمكن أن تكوّن **المحفظة** Capsule في بعض السلالات بتأثير ظروف معيّنة، ويمكن أن تنتج خلايا بعض الأنواع **الصباغ** Pigments بألوان مختلفة (الأسود، والأصفر، والبرتقالي، والبني، والأحمر) ضمن استزراع خاص، معظم أنواع *Bacillus* متحرك بوساطة سياط Flagella محيطية، وفي بعض المراحل لا يرى إلا قليل من السياط، بينما يكون **شكل المستعمرة وحجمها** متبايناً جداً، وربما تنتج الصباغ على أوساط معينة، وعموماً، يتباين مظهر مستعمرات السلالات تبعاً للعوامل البيئية، مثل: تركيب الوسط، ودرجة حرارة الحضن، والرطوبة، إضافة إلى التغيرات في البيئة الناتجة عن تطور السلالة النامية ذاتها، وعلى نحو كبير يعتمد قطر المستعمرات التي تبدو كبيرة عادة على عدد المستعمرات النامية على الطبق، إضافة إلى تركيز العناصر المغذية، وكمية الآغار المغذي، ما عدا قلة من السلالات التي تكوّن مستعمرات صغيرة فقط، وقد وصف سميث Smith et al. مستعمرات الباسيلوس (1952). يُظهر الأطلس الملون الذي طبعه باري وآخرون Parry et al. (1983) خصائص المستعمرات لمعظم أنواع الباسيلوس على أطباق الآغار المدمى، ويبدي بعض أنواعه تغيرات حادة في شكل المستعمرة، وهذا يلاحظ غالباً مع النوع *B. subtilis*، وتلاحظ بنية فريدة جداً في مستعمرات سلالات النوع *B. mycoides* التي تُظهر نمواً جذرانياً يغطي الطبق خلال 24 ساعة، ويكون النمو عادة باتجاه اليسار، وإن كان نمو سلالات قليلة معزولة فقط باتجاه اليمين، وتُظهر مستعمرات المزارع النقية على الطبق ذاته تباينات واضحة قليلاً أو كثيراً في الشفافية أو القتامة أو في شدة البياض أو اللون الكريمي، ويكون معظم مستعمرات الباسيلوس غير ملون، ومما يلفت النظر في هذا الجنس **التنوع الواسع للاحتياجات الغذائية وشروط النمو**، رغم أن غالبية السلالات تنمو جيداً على الآغار المغذي، وقد درست قدرة الأنواع على النمو في درجات الحرارة المنخفضة والمرتفعة ودرجات الحموضة

المنخفضة والمرتفعة من قبل Norris 1981، وتعد الأنواع الأليفة للحرارة والأخرى الأليفة للقلوية ذات أهمية كبيرة بسبب خصائص الإنزيمات ذات القيمة التجارية التي تنتجها [Claus & Berkeley 1986, Kenneth Todar, 2009].

3. التوزع Distribution

توجد الباسيلوس في جميع البيئات (التربة، والماء، والغبار المنقول جواً)، ويوجد بعض الأنواع بشكل طبيعي ضمن فلورا أمعاء الإنسان، ومعظم الأنواع ينتشر بشكل واسع في الطبيعة، ووجودها غير مرتبط بالموئل الطبيعي بالضرورة بسبب الانتشار المنفعل واستمرار ومقاومة الأبواغ، ويعتقد أن تكوّن البوغة الموجود عموماً في أفراد هذه المجموعة استراتيجية للنجاة في بيئة التربة حيث تسود هذه الجراثيم، ووجود هذه الجراثيم في الهواء في معظم المواطن المدروسة يمكن تفسيره بالانتشار الهوائي للأبواغ الهاجعة، وتتوزع أنواعه بشكل كبير في التربة وبدرجة أقل في المياه، ويمكن أن تنتشر في البيئات الشديدة الملوحة [Norris 1981, Claus & Berkeley 1986]، فهي تكوّن 67% من الأنواع التي تنتشر في صورة جماعات على أوساط الآغار المغذية وبأعداد 10^6 - 10^7 في الغرام الواحد من التربة، وتوجد هذه الجراثيم في الترب التي تركت فترة طويلة دون إمداد بالمواد العضوية بصورة أبواغ يمكن أن تبقى ساكنة عدة سنوات، فإذا توافرت لها العناصر الغذائية المناسبة فإنها تبدأ نشاطها مرة أخرى، وتكون نسبة الأبواغ من إجمالي الأبواغ والخلايا الإعاشية 60 - 100 % عادة [حمد 2005].

يشتمل الجنس *Bacillus* على نمطين من المعيشة: نمط يعيش حياة حرة Free-living (مثل *B. subtilis* الذي يعد من أفضل بدائيات النواة Prokaryotes المدروسة في مجالات البيولوجيا الجزيئية Molecular biology وبيولوجيا الخلية Cell biology)، والنمط الثاني ممرض Pathogenic (مثل مسبب مرض الجمرة الخبيثة *B.anthracis*) [Wikipedia 2009].

إن الانتشار الكبير لأنواع الجنس باسيلوس في بيئات متنوعة يعود إلى قدرة بعضها على التكيف مع البيئات القاسية، فهي تتمكّن من النمو في مدى بيئي واسع في حرارة تتراوح بين 2 – 78 ْم، ورقم هيدروجيني بين 2 – 12، وملوحة بين 0 – 30% NaCl، وتحت ضغط 0.1 – 30 Mpa [Hideto 2009]، ولذلك يُظهر أفراد هذا الجنس تنوعاً واسعاً في القدرة الوظيفية بين أليفة القر Psychrophile وأليفة الحر Thermophile، وأليفة للحموضة Acidophile، وأليفة للقلوية Alkaliphile، ويكون بعض السلالات متحملاً للملوحة ولبعضها الآخر متطلبات خاصة من الأملاح، ومما يميز هذه الجراثيم أنها تضم تنوعاً كبيراً في الوظائف Physiology وقدرة على تفكيك معظم المواد Substrates المشتقة من مصادر نباتية أو حيوانية التي تشتمل على السليلوز Cellulose، والنشاء Starch، والبكتين Pectin، والبروتينات Proteins، والآغار Agar، والهيدروكربونات Hydrocarbons، وغيرها. ويحقق بعض

الأنواع عملية النترجة Nitrification، ونزع النتروجين Denitrification، وتثبيت النتروجين Nitrogen fixation [Claus and Berkeley1986, Kenneth Todar 2009].

4. الدراسات التصنيفية Classification studies

أجرى سميث وآخرون Smith & othres أول دراسة تصنيفية لهذا الجنس في عام 1946 معتمدين في دراستهم على الصفات المظهرية والحيوية الكيميائية، حيث تم تحديد 19نوعاً، وأضاف غوردن وآخرون Gorden & others ثلاثة أنواع أخرى، ويضم الجنس *Bacillus* اليوم نحو 200 نوع [Claus and Berkeley 1986].

واعتمدت المحاولات الأولى لتصنيف الباسيلوس على ميزتين هما: النمو الهوائي وتكوين البوغة الداخلية، ونتج عن هذا تجمع العديد من الجراثيم التي تمتلك أنماطاً فيزيولوجية مختلفة، وتشغلمواطن متنوعة في نطاق واحد،ونظراً إلى تغاير الخواص الفيزيولوجية والبيئية والوراثية كان من الصعب تصنيف الجنس *Bacillus* أو إطلاق تعميمات حوله، ففي الطبعة الأولى من دليل برجي Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st ed. 1986) يلاحظ أن محتوى أنواع الجنس *Bacillus* المعروفة من الأساسين G+C يتراوح بين 32 - 69%، كما كشفت اختبارات تهجين الدنا DNA Hybridization تغاير الخواص المورثية، ولم يكن هنالك تباين من نوع إلى نوع آخر فقط، بل وجدت حالات اختلاف عميقة في محتوى G+C ضمن سلالات الأنواع، فعلى سبيل المثال تراوح محتوى G+C لمجموعة *Bacillus megaterium* بين 36 - 45%، وبقي الجنس *Bacillus* دون تغيير حتى العام 2004، حيث وزع ضمن عدة فصائل وأجناس من الجراثيم المكوّنة للأبواغ، اعتماداً على تحاليل ssRNA، ففي الطبعة الثانية من دليل برجي(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. 2004) ظهر مخططات تصنيفية عرقية Phylogenetic classification تتألف من النمطين الأكثر وضوحاً في الجراثيم المكونة للأبواغ، هما Clostridia وBacilli، في صفين مختلفين من الخيطيات Firmicutes هما Clostridia وBacilli.

صف <u>Clostridia</u>

يضم الرتبة Clostridiales ومنها الفصيلة Clostridiaceae التي تشتمل على 11 جنساً بما فيها الجنس *Clostridium*.

صف <u>Bacilli</u>

يضم الرتبة Bacillales ومنها الفصيلة Bacillaceae التي تشتمل على 37 جنساً جديداً بالتوازي مع الجنس *Bacillus*، وهذا يفسر التباين في محتوى G+C الملاحظ في الجنس *Bacillus* 1986.

يعتمد التصنيف على القرابة للجنس *Bacillus* ليكون منجزاً إنجازاً كاملاً باستعمال تحاليل جزيئات الرنا الريبوزرومي 16s (16s rRNA)بوساطة تقانة السَلسلة عديدة النكليوتيد Oligonucleotide sequencing، وتكشف هذه التقانة أيضاً علاقات القرابة التطورية Phylogenetic relationships، حيث أظهرت أنواع *Bacillus* على نحو مدهش قرابة مع أنواع غير مكونة للأبواغ تضم *Enterococcus* و *Lactobacillus* و *Streptococcus* عند مستوى الرتبة، و *Listeria* و *Staphylococcus* عند مستوى الفصيلة.

ومن ناحية أخرى فقضمُّ بعض الأعضاء السابقين في الجنس *Bacillus* حالياً إلى فصائل جديدة تشمل: Acyclobacillaceae، Paenibacillaceae، و Planococcaceae بالتوازي مع فصيلة Bacillaceae.

التصنيف الهرمي لهذه الفصائل الأربعة بحسب Bergey's 2004 كالآتي:

مملكة الجراثيم Kingdom Bacteria

شعبة الخيطيات Phylum Firmicutes

صف العصيَّات Class Bacilli

رتبة العصيَّات Order Bacillales

وتضم رتبة العصيَّات الفصائل الآتية:

فصيلة Acyclobacillaceae:

ينتمي الجنس *Acyclobacillus* إلى هذه الفصيلة.

فصيلة Bacillaceae

ينتمي الجنسان *Bacillus* و *Geobacillus* إلى هذه الفصيلة.

فصيلة Paenibacillaceae

ينتمي الجنسان *Paenibacillus* و *Brevibacillus* إلى هذه الفصيلة.

فصيلة Planococcaceae

ينتمي الجنس *Sporosarcina* إلى هذه الفصيلة.

والجدول الآتي يبيّن ممثلات سابقة في الجنس *Bacillus* نقلت إلى فصائل أو أجناس أخرى (الجدول 4-1) [Kenneth Todar 2009].

الجدول 4-1 التغيرات التصنيفية المهمة في الجنس ***Bacillus*** (1986-2004)

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1st ed. 1986)	Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd ed. 2004),
Bacillus acidocalderius	*Acyclobacillus acidocalderius*
Bacillus agri	*Brevibacillus agri*
Bacillus alginolyticus	*Paenibacillus alginolyticus*
Bacillus amylolyticus	*Paenibacillus amylolyticus*
Bacillus alvei	*Paenibacillus alvei*
Bacillus azotofixans	*Paenibacillus azotofixans*
Bacillus brevis	*Brevibacillus brevis*
Bacillus globisporus	*Sporosarcina globisporus*
Bacillus larvae	*Paenibacillus larvae*
Bacillus laterosporus	*Brevibacillus laterosporus*
Bacillus lentimorbus	*Paenibacillus lentimorbus*
Bacillus macerans	*Paenibacillus macerans*
Bacillus pasteurii	*Sporosarcina pasteurii*
Bacillus polymyxa	*Paenibacillus polymyxa*
Bacillus popilliae	*Paenibacillus popilliae*
Bacillus psychrophilus	*Sporosarcina psychrophilia*
Bacillus stearothermophilus	*Geobacillus stearothermophilus*
Bacillus thermodenitrificans	*Geobacillus thermodenitrificans*

5. الأهمية التطبيقية Application Importance

إن تنوع وتوزع هذه الجراثيم في الطبيعة، ومقاومة أبواغها الداخلية غير العادية للعوامل الكيميائية والفيزيائية، والدورة المتطورة لتكوين الأبواغ وإنتاجها للصادات الحيوية، وسمية أبواغها الداخلية وبلوراتها البروتينية للعديد من الحشرات، والعامل الممرض *B. anthracis*، كانت عوامل لجذب اهتمام متزايد بهذه الجراثيم منذ اكتشافات كون Cohn وكوخ Koch في العام 1872.

تؤثربعض أنواع الباسيلوس في نمو النباتات وفي العوامل الممرضة الموجودة في التربة، حيث أظهرت هذه الجراثيم قدرة على زيادة الغذاء المتاح في المحيط الجذري Rhizosphere، فمثلاً للنوع *B. megaterium* قدرة لعى تثبيت النتروجين الجوي وإنتاج منظمات النمو (الأوكسين Auxin،

والسيتوكينينات Cytokinis و/أو الجبرلينات Giberelins)، إضافة إلى أن بعض أنواع الباسيلوس تمتلك فعالية تجاه عدد من أنواع الفطريات والجراثيم الممرضة الموجودة في التربة [Clanway P. 2002, Toure et al. 2004].

يمتلك معظم الأنواع العائدة لهذا الجنس ميزات متنوعة (مثل تحملها لدرجات الحرارة و الرقم الهدروجيني pH والملوحة المتطرفة) جعلتها ذات تطبيقات صناعية واقتصادية، كما أنها تمتلك تاريخاً طويلاً ومميزاً في مجالات التقانات الحيوية، ومن المحتمل أن اليابانيين قد استعملوها أولاً في تحضير طعام شعبي مخمر من قش الأرز وفول الصويا [Ueda1989]، أما في الغرب فإن استثمار الجنس *Bacillus* فهو أكثر حداثة، حيث بدأ تصنيع الأميلاز Amylases والبروتياز Proteases في بداية القر ن العشرين، إلا أن استعمالها و إنتاجها على نحو ذي قيمة قد تأخر إلى ما بعد عام 1950 عندما أمكن الحصول على فوائد من إضافة البروتياز القلوي Alkaline protease الذي ينتجه النوع *B. licheniformis* إلى مساحيق الغسيل، ثم تبعت ذلك تطورات في عمليات تصنيع النشاء المعتمدة على α- amylase المنتج بفعل *B. licheniformis* في التحويل الجز يئي للنشاء إلى محاليل ذرة عالية الفركتوز كبدائل للسكروز في الأطعمة والأشربة [Priest 1989].

يضم الجنس *Bacillus* العديد من الأنواع التي لها استعمالات عديدة، فمنها ما يستعمل في المكافحة الحيوية كالنوع *B. thuringiensis* الذي عزل في بداية القرن العشرين، حيث أظهرت البروتينات المتبلورة المنتجة في مرحلة التبوغ من عدد من سلالات *B. thuringiensis* فعالية ضد يرقات عدد كبير من الحشرات [Feitelson et al. 1992] وضد خلايا السرطان البشرية [Lee et al. 2000]، وكذلك فإنه مصدر لعدد كبير من إنزيمات الحلمهة Lytic Enzymes،و الصادات الحيوية Antibiotics، ومحسنات النكهة Flavor Enhancers، والعوامل المخفضة للتوتر Surfactants، ومنتجات عديدة أخرى [Priest 1992]. الجدول (1-5) يبيّن بعض الإنزيمات الصناعية المهمّة المنتجة بوساطة الجنس *Bacillus*.

الجدول 1-5 إنزيمات منتجة من أنواع الجنس *Bacillus* [عن Fariha et al. 2006].

المرجع	الإنزيم	المرجع	الإنزيم
Ahn S, et al. 2001	Pyrophosphatase	Singh J. et al. 2004	Cellulase
Hansson M,1994	Ferrochelatase	Najafi MF et al. 2005	Amylase
Balaban N, et al.2004	Serine protease	Lianghua T. 2005	Lipase
Tang XM,et al.2004	Alkaline protease	Moriya RY,et al. 2005	Xylanase
Gerze A. et al.2005	Neutral protease	Alvarez-Macarie E,et al. 1999	Esterase
He GQ,et al. 2004	Elastase	Werlang PO,2005	Phytase
Tang XG, et al. 2004	Beta-glucanase	Ramnani P, et al. 2005	Keratinase

رابعاً . إجراءات العزل Isolation Procedures

يمكن عزل الجراثيم الهوائية المكونة لأبواغ الجنس باسيلوس من معظم البيئات الطبيعية والعديد من المصادر الأخرى، وتوجد بشكل أكثر شيوعاً في التربة والبقايا النباتية حيث تتميز بدور مهم في الدورة الحيوية للكربون والنتروجين، كما يمكن أن توجد في بيئات أخرى (الماء العذب، وماء البحر الملوث، والرواسب البحرية العميقة، والأطعمة، والحليب، والمواد الصيدلانية...)، وربما وصلت إليها من التربة بوساطة ماء الأمطار أو الغبار أو من المواد النباتية الحاملة لها وغير ذلك، ومثل هذه البيئات المذكورة أعلاه ربما تؤمّن الظروف الملائمة لنمو أنواع الباسيلوس أو أنها تؤوي الأبواغ فقط، وتتمكّن هذه الأخيرة من البقاء في أية بيئة مدة طويلة بسبب قوتها الاستثنائية في المقاومة والهجوع.

إن طرائق العزل والتحديد لسلالات الباسيلوس تعتمد بشكل أساسي على مقاومة أبواغها للحرارة العالية، إذ إن التسخين إلى ما فوق الدرجة 70° م مدة 10 دقائق أو أكثر سيخرّب الخلايا الإعاشية لمعظم الجراثيم المعروفة، وتنجو أبواغ سلالات الباسيلوس والجراثيم غير المتبوغة المتحمّلة للحرارة العالية من هذه المعاملة، وربما تمتلك أيضاً متطلبات حرارية محفزة مختلفة لإنتاش ونمو أفضل، ولهذا السبب يصعب عادة التحديد الدقيق للعدد الحقيقي للأبواغ الموجودة في عينة من الطبيعة.

وكذلك، وعلى نحو مغاير للخلايا الإعاشية لمعظم الجراثيم، فإن أبواغ الباسيلوس مقاومة جداً للتجفيف، ولذلك فإنه عند تمرير هواء جاف ضمن عينة التربة يتعرّض معظم الجراثيم للتخريب، بينما تنجو الجراثيم المكونة للأبواغ والجراثيم المنتجة لمواد واقية (مثل: أنواع *Azotobacter*).

كما أن أبواغ الباسيلوس مقاومة للمواد الكيميائية المطهرة أكثر من خلايا معظم الجراثيم، ولذلك يمكن استعمال الإيتانول لعزل سلالات الباسيلوس حيث تقتل الخلايا الإعاشية في العينة بينما تنجو الأبواغ الداخلية الأكثر مقاومة، وقد أظهرت دراسة لبعض سلالات الباسيلوس أن الأبواغ تنجو في وسط من الإيتانول بتركيز 50% (حجم/حجم) مدة 1 ساعة على الأقل، بينما تقتل الخلايا الإعاشية للباسيلوس والأنواع الجرثومية الأخرى.

وعلى هذا، يمكن إجراء العزل بالتجفيف بالهواء، أو بالمعاملة بالحرارة أو بالإيتانول، وتتوافر طرائق العزل المباشر لأنواع قليلة من الباسيلوس حالياً، ويمكن الحصول على سلالات أنواع أخرى من مواطنها الطبيعية بتطبيق تقنيات الإثراء باستعمال بيئة سائلة نوعية تحضن تحت ظروف كيميائية وفيزيائية محددة، ثم تزرع في ظروف هوائية على أطباق وسط الآغار النوعي، وقد تبين في العديد من الحالات أنه من المفيد أخذ 4 غ من عينة تربة مجففة ووضعها في بيشر وإضافة 20 مل من الماء المعقم إليها، وتسخين البيشر في حمام مائي مدة 10 دقائق حتى درجة الحرارة 80° م مع التحريك اللطيف للمحتويات، وتكون العينة جاهزة للزرع عندئذ [Claus and Berkeley 1986].

خامساً . إجراءات الحفظ Maintenance Procedures

من المفضل أن تحفظ المزارع المتبوغة على الآغار المائل المحمي من الجفاف في جو الغرفة أو أدنى مدة سنة على الأقل، وسوف ينجو العديد من السلالات مدة 10 سنوات أو أكثر في هذه الشروط (لا تحفظ بالزرع المتكرر بفترات قصيرة تجنباً لحدوث طفرات) و لاكوّن سلالات الباسيلوس أبواغاً على جميع الأوساط، وعلى نحو مميز لا تسمح البيئة السائلة عادة بتكوين الأبواغ وباستثناء السلالات التي لها متطلبات غذائية خاصة يفضل عموماً زرع مزارع الباسيلوس المراد تخزينها على الآغار المغذي المكون من [Claus and Berkeley 1986]:

- ببتون 5 غ
- مستخلص اللحم 3 غ
- مستخلص خميرة 1 غ
- آغار 15 غ
- ماء مقطر 1000 مل
- الرقم الهدروجيني 6.8

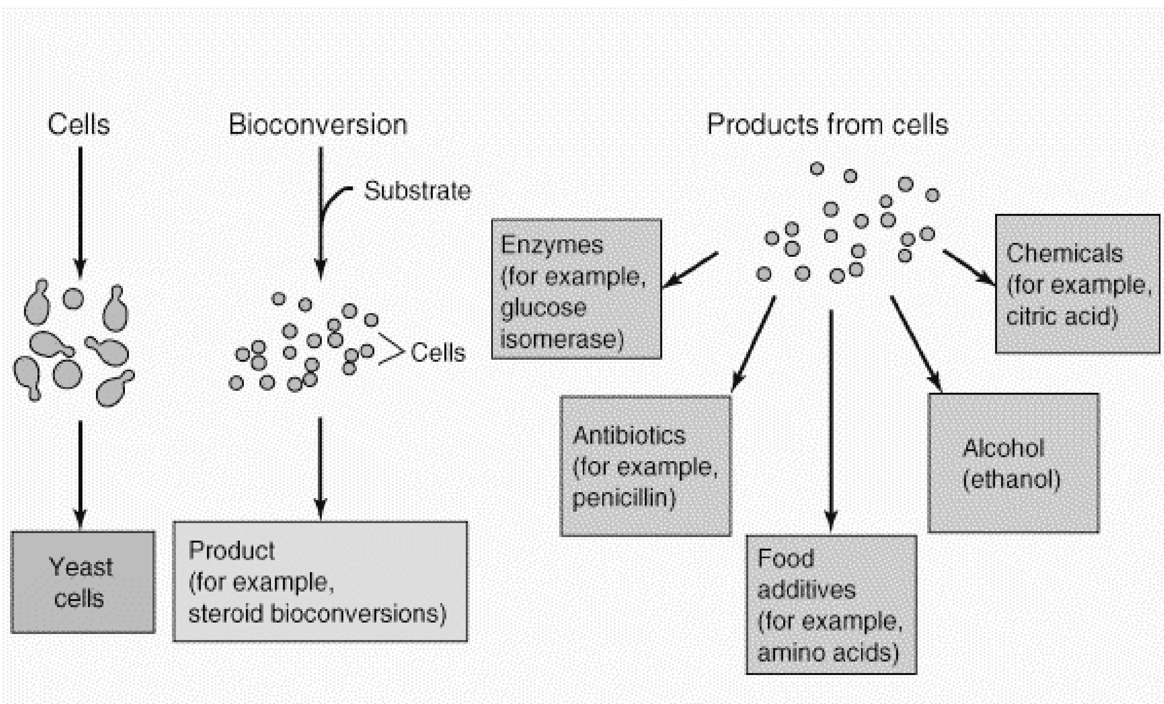
ويتطلبالتبوغ عموماً إضافة تركيز ات من بعض العناصر النادرة وخاصةً شوارد المنغنيز أعلى من تلك الضرورية للنمو الإعاشي، وبما أن الببتون والركائز العضوية المشابهة تحتوي عادة تركيزات قليلة جداً من هذه العناصر رفما تحسّن إضافتها إلى وسط الزرع المعد للتخزينكوتّن الأبواغ. ومن أجل السلالات التي لا تكون الأبواغ على وسط الآغار المغذي الموصوف في الأعلى أو تلك التيكوّن أعداداً قليلة يجب تزويد الوسط بمقدار 50 ملغ/ل من كبريتات المنغنيز المائية ($MnSO_4.H_2O$)، ويمكن أن يكون مفيداً التزويد الإضافي بكلور الكلسيوم $CaCl_2.2H_2O$ (100 ملغ/ل)، وكبريتات المغنزيوم $MgSO_4.7H_2O$ (500 ملغ/ل). ويمكن أن يتم تحفيز التبوغ لسلالات أخرى بإضافة مستخلص التربة إلى الآغار المغذي، وكذلك يمكن حفظ سلالات الباسيلوس المتبوغة أو غير المتبوغة فترة طويلة بطريقة التجفيد Freez-drying وتخزن تحت التفريغ. وكبقية الجراثيم الموجبة بصبغة غرام فإن الباسيلوس تنجو عادة من هذه المعاملة وتعود إلى الحياة بشكل جيد. وكوسط تعليق مناسب يستعمل حليب منزوع القشدة حيث يحضر من بودرة حليب مقشود (20% وزن/حجم) يضاف إليها (5% وزن/حجم) ميزوا إينوزيتول، وهنالك أوساط أخرى وصفها بعض الباحثين، ويمكن حفظجميع السلالات تقريباً فترات طويلة في النتروجين السائل باستعمالمرق مغذٍ مزود بنسبة 10% (حجم/حجم) غليسيرول، أو 5% (حجم/حجم) dimethyl sulfoxide كوسط يحمي من الصقيع ويُوصى بتخزين الخلايا الإعاشية لسلالات الباسيلوس في النتروجين السائل بوجود مواد تحميهان التجمّد، حيث لم يلاحظ حدوث طفرات تحت هذه الظروف [Claus and Berkeley 1986].

سادساً . أهمية الأحياء الدقيقة في الصناعة
Microorganisms Importance in Industry

استعملت الأحياء الدقيقة في التصنيع الغذائي، واستخراج مواد عضوية وطبية منذ القدم، ولكنها ظلت في حدود الإمكانات والمواد المتاحة، غير أنه عندما بدأ الوعي والإدراك بدور الأحياء الدقيقة يتنامى منذ منتصف القرن التاسع عشر نتيجة للأبحاث والدراسات التي أجراها الرواد الأوائل مثل باستور وغيره، أصبح من الممكن القول إن الأحياء الدقيقة هي مصنع كيميائي يمكن في ظروف معينة إنتاج مئات المنتجات الغذائية والصناعية والطبية نتيجة للتغيرات الكيميائية التي تحدثها على بعض المواد الخام الرخيصة الثمن والمتوافرة بكميات كبيرة إلى منتجات أخرى ذات فائدة غذائية أو صناعية أو دوائية.

ويمكن تقسيم المنتجات الكيميائية للأحياء الدقيقة إلى قسمين:

- الأول يسمى المُستقْلبات الأولية (Primary metabolites)، مثل: الحموض الأمينية، والفيتامينات.
- الثاني يسمى المُستقْلبات الثانوية (Secondary metabolites)، ومن أهمها: الإنزيمات، و الصادات الحيوية (الشكل 1-3).



الشكل 1-3 بعض المُتَقْلَبات الأولية والثانوية للأحياء الدقيقة.

سابعاً . الإنزيمات Enzymes

الإنزيمات وسائط حيوية ذات طبيعة بروتينية تؤمّن حدوث التفاعلات الاستقلابية (من تركيب وهدم) في الخلية الحية، وهي ذات خواص مهمة، فهي تؤثر بتراكيز ضئيلة جداً وتسرّع التفاعل الذي تتدخل فيه بدرجات كبيرة (من 10^3 إلى 10^6 مقارنة بحدوث التفاعل دون تدخّل الإنزيم)، كما أنها ذات اصطفائية عالية جداً.

وقد تم الاعتراف الصريح بوجود وسائط حيوية نوعية على يد العالمين الفرنسيين Payan وPersoz في عام 1833 عندما لاحظا أن خلاصة الشعير تحتوي مادة عطوبة حرارياً (تفقد فاعليتها بالحرارة العالية) قادرة على تحويل النشاء إلى سكر بسيط.

وتطور علم الإنزيمات نتيجة لتطور التقانات، وتشعب هذا العلم في اتجاهات عديدة، وأصبح على ارتباط وثيق بعدد من العلوم، مثل:

- الكيمياء الحيوية
- الكيمياء الفيزيائية
- علم الأحياء الدقيقة

تسمى الإنزيمات التي يمكنها أن تعبر الغشاء السيتوبلاسمي إلى خارج الخلية بالإنزيمات الخارجية Exoenzymes، حيث تفرز الإنزيمات خارج خلايا الأحياء الدقيقة للاستفادة من المواد ذات الوزن الجزيئي الكبير الموجودة في البيئة، حيث تقوم بتفكيكها إلى مكونات ذات وزن جزيئي منخفض يمكنها دخول الخلايا، ثم الاستفادة منها في العمليات الاستقلابية، وبناء عليه فإن الإنزيمات الخارجية التي تفرز خارج خلايا الأحياء الدقيقة تعد من الصفات المميزة لها، ومن أشهر السلالات الجرثومية التي تتصف بالقدرة على إفراز الإنزيمات الخارجية: الجراثيم التابعة للجنس *Bacillus* [زهران وبريشة 2006].

يُنتج معظم الإنزيمات حالياً بوساطة تخمير المخلفات الحيوية [Louwrier 1998]، وتعد الإنزيمات التي تنتجها الأحياء الدقيقة أكثر فائدةً من الإنزيمات النباتية والحيوانية بسبب تنوعها الكبير، وإمكان الحصول على كميات كبيرة منها، وسهولة التغيير الوراثي، وإنتاجها المستمر بسبب عدم وجود موسم إنتاج وإمكان نموها السريع على أوساط رخيصة الثمن، وكذلك تبدو إنزيمات الأحياء الدقيقة أكثر ثباتاً من نظيراتها النباتية والحيوانية، وإنتاجها أكثر سهولة وأماناً [Wiseman A. 1995].

وقد اختبر نحو 2% من الأحياء الدقيقة فقط كمصادر منتجة للإنزيمات، وعموماً، فالجراثيم أكثر استعمالاً في هذا المجال مقارنة بالخمائر نظراً إلى فعاليتها العالية، ووجود سلالات طبيعية متحملة للأوساط القلوية والحرارة العالية [Frost and Moss 1987].

ثامناً. الإنزيمات والصناعة Enzymes and Industry

استعملت الإنزيمات على نطاق تجاري منذ زمن بعيد في دباغة الجلود، وفي صناعة الجبن، وفي صناعة الخبز، وفي صناعات أخرى، وقد استعملت الأحياء ذاتها (الكائن الحي بالكامل) في البداية، ولم تكن طرائق استخلاص الإنزيمات من خلايا الأحياء الدقيقة معروفةً بعد. إن نشوء ما يعرف بالإنزيمات التجارية في صورتها النقية جزئياً لم تعرف إلا في نهاية القرن التاسع عشر.

ويعد العالم تاكامين Takamine الياباني أول صاحب براءة اختراع في مجال الإنزيمات في العام 1894، حيث قام بتنمية الفطر *Aspergillus oryzae* على رز مبلل أو نخالة القمح لإنتاج الأميلاز، وبعد استخلاص الإنزيم من الفطر بنحو عشرين عاماً أمكن الحصول على الإنزيمات الجرثومية من الجراثيم التابعة للجنس *Bacillus*. وفي الخمسينات من القرن العشرين أُنتجت مساحيق الغسيل الحاوية الإنزيمات، مثل: إنزيم البروتياز القاعدي الذي أنتج من النوع *Bacillus licheniformis* [زهران وبريشة 2006, Ole Kirk et al. 2002].

ونتيجة لتطور التقنيات المستعملة في إنتاج الإنزيمات من الأحياء الدقيقة أصبحت الإنزيمات المنتجة بفعل هذه الأحياء تحتل مرتبة مهمة في الصناعات المختلفة لما تتميز به من خواص تقنية واقتصادية مقارنة بالمصادر الأخرى للإنزيمات سواء أكانت حيوانية أم نباتية. ففي مجال صناعة الألبان، على سبيل المثال، استبدلت المنفحة الحيوانية بما يعرف بالمنفحة الميكروبية Microbial rennet التي تستعمل في صناعة الجبن، كما استعملت إنزيمات الأحياء الدقيقة في تحويل النشاء إلى خليط من الغلوكوز والفركتوز يستعمل حالياً كمادة تحلية Sweetener لبعض الأغذية، إضافة إلى العديد من التطبيقات الصناعية الأخرى [زهران وبريشة 2006, Ole Kirk et al. 2002].

يمكن استخلاص الإنزيمات الفعالة حيوياً من كثير من الأحياء، وقد استعملت مصادر متنوعة من الأحياء لإنتاج الإنزيمات تجارياً، وبسبب زيادة كمية الإنزيمات المطلوبة في المجال الصناعي فإنها غالباً ما تنتج بمساعدة الأحياء الدقيقة حيث تفرز هذه الإنزيمات في وسط الزرع المحفز على إنتاجها، كما أن الأحياء الدقيقة تتصف بتنوع حيوي طبيعي حيث يمكن بسرعة غربلتها، وتنميتها، وتحسين إنتاجيتها ومردودها باستعمال تقنيات التخمير الصلبة والسائلة [Santiago et al. 2005].

يتبع معظم الجراثيم المنتجة للإنزيمات التجارية للجنس *Bacillus* [زهران وبريشة 2006]، وتقدر الإنزيمات التي تنتج من سلالات *Bacillus sp.* بأكثر من 50% من الإنتاج العالمي للإنزيمات [Schallmey et al. 2004].

هنالك إنزيمات مستعملة صناعياً يزيد عددها على مئة إنزيم تتوزع مصادرها على النحو الآتي: مصدر أكثر من نصفها هو الفطريات (الأعفان) والخمائر، وأكثر من ثلثها من الجراثيم، والباقي موزع بين 8% من الحيوانات و 4% من النباتات، ويبين الجدول 1-6 بعض الإنزيمات المهمة صناعياً ومصادرها.

الجدول 1-6 بعض الإنزيمات المهمة صناعياً ومصادرها.

الإنزيم	الرمز التصنيفي	المصدر	إنزيم داخل أو خارج خلوي	كمية الإنتاج	الاستعمال الصناعي
الإنزيمات الحيوانية					
Catalase	1.11.1.6	الكبد	I	-	الأغذية
Chymotrypsin	3.4.21.1	البنكرياس	E	-	الجلود
Lipasee	3.1.1.3	البنكرياس	E	-	الأغذية
Rennetf	3.4.23.4	المنفحة	E	+	الأجبان
Trypsin	3.4.21.4	البنكرياس	E	-	الجلود
الإنزيمات النباتية					
Actinidin	3.4.22.14	فاكهة الكيوي	E	-	الأغذية
α-Amylase	3.2.1.1	الشعير المنقوع	E	+++	البيرة
β-Amylase	3.2.1.2	الشعير المنقوع	E	+++	البيرة
Bromelain	3.4.22.4	عصارة الأناناس	E	-	البيرة
-Glucanaseg	3.2.1.6	الشعير المنقوع	E	++	البيرة
Ficin	3.4.22.3	عصارة التين	E	-	الأغذية
Lipoxygenase	1.13.11.12	فول الصويا	I	-	الأغذية
Papain	3.4.22.2	عصارة الببو	E	++	لحم
الإنزيمات الجرثومية					
α-Amylase	3.2.1.1	*Bacillus*	E	+++	النشاء
β-Amylase	3.2.1.2	*Bacillus*	E	+	النشاء
Asparaginase	3.5.1.1	*Escherichia coli*	I	-	الصحة
Glucoseisomeraseh	5.3.1.5	*Bacillus*	I	++	شراب الفركتوز
Penicillin amidase	3.5.1.11	*Bacillus*	I	-	الدواء
Proteasei	3.4.21.14	*Bacillus*	E	+++	المنظفات
Pullulanasej	3.2.1.41	*Klebsiella*	E	-	النشاء
الإنزيمات الفطرية					
α-Amylase	3.2.1.1	*Aspergillus*	E	++	الخبز
Aminoacylase	3.5.1.14	*Aspergillus*	I	-	الدواء
Glucoamylasek	3.2.1.3	*Aspergillus*	E	+++	النشاء
Catalase	1.11.1.6	*Aspergillus*	I	-	الأغذية
Cellulase	3.2.1.4	*Trichoderma*	E	-	المخلفات
Dextranase	3.2.1.11	*Penicillium*	E	-	الأغذية

Glucoseoxidase	1.1.3.4	*Aspergillus*	I	-	الأغذية
Lactasel	3.2.1.23	*Aspergillus*	E	-	الألبان
Lipasee	3.1.1.3	*Rhizopus*	E	-	الأغذية
Rennetm	3.4.23.6	*Mucor miehei*	E	++	الأجبان
Pectinasen	3.2.1.15	*Aspergillus*	E	++	المشروبات
Pectin lyase	4.2.2.10	*Aspergillus*	E	-	المشروبات
Proteasem	3.4.23.6	*Aspergillus*	E	+	الخبز
Raffinaseo	3.2.1.22	*Mortierella*	I	-	الأغذية
الإنزيمات الخمائرية					
Invertasep	3.2.1.26	*Saccharomyces*	I/E	-	الحلويات
Lactasel	3.2.1.23	*Kluyveromyces*	I/E	-	الألبان
Lipasee	3.1.1.3	*Candida*	E	-	الأغذية
Raffinaseo	3.2.1.22	*Saccharomyces*	I	-	الأغذية

I: إنزيم داخل خلوي   +: أكثر من 1 طن سنوياً   ++: أكثر من 10 طن سنوياً

E: إنزيم خارج خلوي   +++ : أكثر من 100طن سنوياً   - : أقل من 1 طن سنوياً

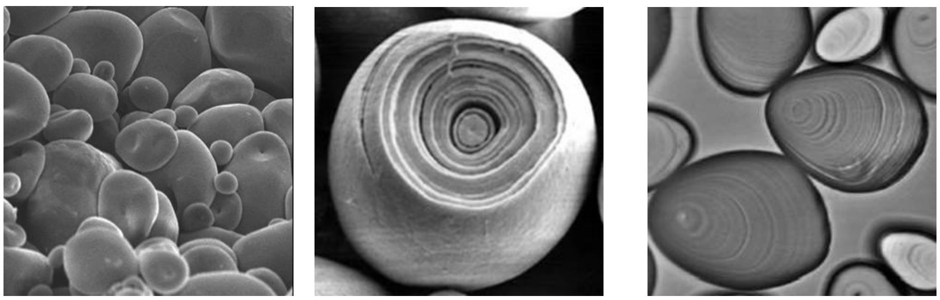
ويبين الجدول 1-7 تطور استهلاك الإنزيمات في أهم الصناعات بين عامي 2000– 2005 [Rajan M. 2008].

الجدول 1-7 استهلاك الإنزيمات في أهم الصناعات بين عامي 2000-2005

المجال التطبيقي	2000 مليون دولار	2005 مليون دولار	معدل النمو السنوي(%) بين 2005 – 2000
الغذاء وتغذية الحيوانات	251.0	294.5	3.2
المنظفات	113.4	145.0	5.0
الصناعات الكيميائية	70.8	89.5	4.8
النسيج والجلود والفرو	48.7	58.7	3.8
الورق	30.2	41.6	6.6
الإجمالي	514.1	629.3	4.1

تاسعاً . النشاء Starch

ينتج النشاء بشكل حبيبات Granules (الشكل1-4) في معظم الخلايا النباتية، وهي غير قابلة للذوبان في الماء، ويكوِّن النشاء معظم السكريات التي تخزنها النباتات الراقية، ويتم إنتاجه تجارياً من البذور أو الدرنات أو الجذور، والمصدر الرئيس للنشاء في الدول الغربية هو الذرة، وفي البلاد النامية درنات الكاسافا وسوق نبات الساجو Sago، وتختلف حبيبات النشاء في بنيتها وتركيبها باختلاف المصدر النباتي المأخوذ منه النشاء ولكنها جميعاً تتكون من مركبين جزيئيين رئيسين لهما وزن جزيئي كبير، كلاهما مكون من وحدات ألفا-دي-غلوكوز هما: الأميلوز Amylose 20 - 30%: سلسلة مستقيمة تتكون من نحو 10^3 وحدة غلوكوز ترتبط بالرابطة ألفا 1-4، الأميلوبكتين Amylopectin 70 - 80%: متفرع بدرجة كبيرة ويتكون من نحو 10^4 – 10^5 وحدة غلوكوز مرتبطة بالروابط ألفا 1-4 وألفا 1-6 عند نقاط التفرع (الشكل1-5) [زهران وبريشة 2006].

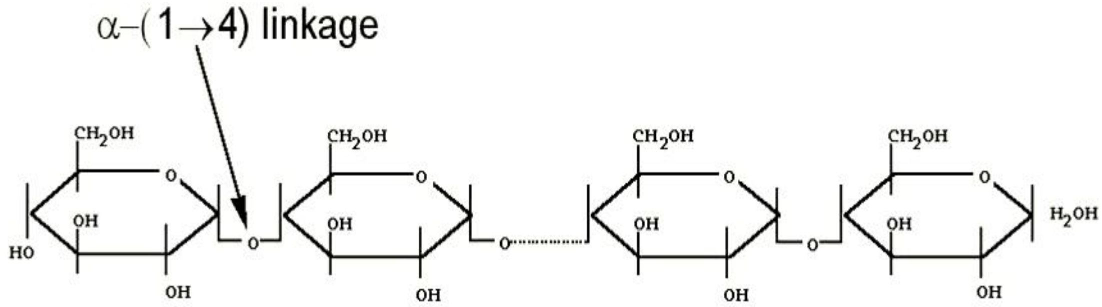


الشكل1-4 أشكال حبيبات النشاء

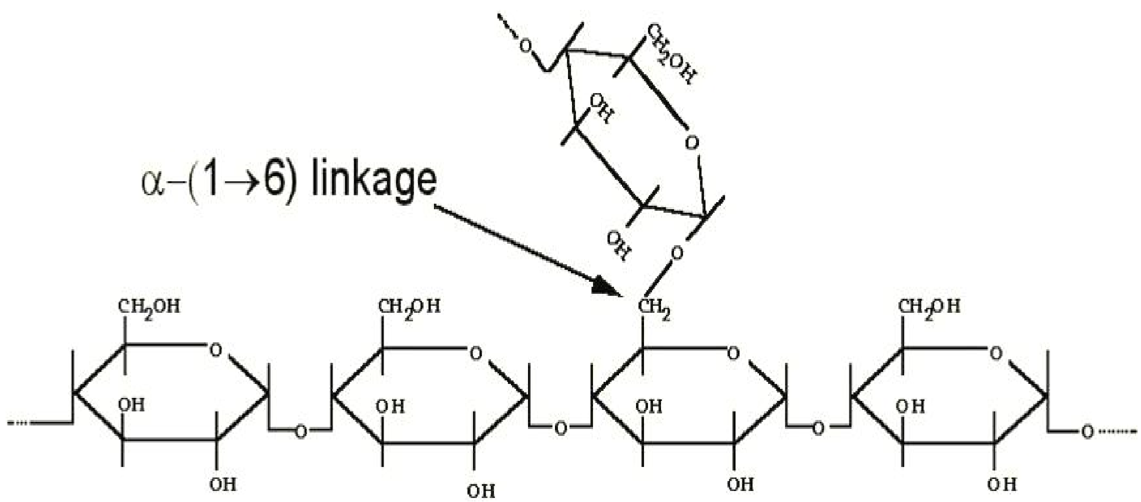
من المفضل في التطبيقات الصناعية استعمال حبيبات النشاء التي يتراوح حجمها بين 2 – 30 ميكرومتراً (نشاء الذرة) و 5 – 100 ميكرومتر (نشاء البطاطا) [Robyt 1998].

ويكون جزيء الأميلوبكتين قابلاً للانحلال في الماء، بينما يكون جزيء الأميلوز وحبيبات النشاء غير منحلة في الماء البارد؛ الأمر الذي يجعل من السهل نسبيّاً استخلاص حبيبات النشاء من مصدرها النباتي وعندما يسخّن ملاط النشاء تنتفخ حبيبات النشاء حتى تصل إلى نقطة يكون عندها الانتفاخ غير عكوس، وتدعى هذه العملية التهلّم Gelatinization، وخلال هذه العملية تخرج جزيئات الأميلوز من الحبيبات وتزيد من لزوجة الملاط Slurry، وبعد ذلك تؤدي زيادة أعلى في درجة الحرارة إلى انتفاخ أعظميٍّ لحبيبات النشاء وزيادة في اللزوجة، وتتحطم الحبيبات إلى أجزاء لينتج في النهاية قوام غرواني لزج مفتت تماماً، ويؤدي التبريد الفوري بعد هذه العملية إلى تكوين هلام دبق مطاطي، ويخضع النشاء عندئذ إلى تغيّر من حالة مفككة ومنحلة إلى حالة مترابطة Associated، ويعود السبب في ذلك إلى وجود جزيء الأميلوز، بينما يكون جزيء الأميلوبكتين أقل ميلاً للارتباط بسبب بنيته شديدة التفرع [Marc et al. 2002].

أما بعد انحلال حبيبات النشاء وتحرر جزيئات الأميلوز والأميلوبكتين في الماء فتجري عملية الحلمهة.



جزيء أميلوز Amylose



جزيئ أميلوبكتين Amylopectin

الشكل1-5 بنية الأميلوز والأميلوبكتين

عاشراً. الإنزيماتالمحوّلة للنشاء Starch-converting enzymes

إن تحويل النشاء إلى محاليل سكرية وديكسترينات أو دبس هو الأساس في الصناعات النشوية، وتستعمل هذه المحاليل في الصناعات الغذائية، والمشروبات،ومصدراً للكربون في عمليات التخمر، وقد كان الحصول على محاليل النشاء يتم في الماضي عن طريق الحلمهة الحمضية إلا أن الحلمهة الإنزيمية أصبحت هي السائدة نظراً إلى ما لها من ميزات مقارنة بالحلمهة الحمضية ويمكن تلخيصها بالآتي:

1. ينتج عن الحلمهة الإنزيمية نواتج وسطية أقل، وبالتالي يمكن تجنب النكهة غير المرغوبة.
2. الإنزيمات متخصصة، ولذلك فإن النواتج النهائية تكون متجانسة ولها صفات فيزيائية مرغوبة، مثل: الضغط الأسموزي، ودرجة الحلاوة، ودرجة المقاومة للتبلور.
3. تكون كمية الناتج النهائي للحلمهة الإنزيمية أعلى بكثير من كمية الناتج النهائي للحلمهة الحمضية حيث أن الحلمهة الإنزيمية لا ينتج عنها سكر محروق أو غير صالح.

إذاً ، فكفاءة الحلمهة الإنزيمية أعلى بكثير من الحلمهة الحمضية، ولذلك قد حلّت الحلمهة الإنزيمية Enzymatic hydrolysis للنشاء حالياً مكان الحلمهة الحمضية Acid hydrolysis في أكثر من 75% من عمليات حلمهة النشاء [زهران وبريشة 2006، Kandra L. 2003].

و هناك أربع مجموعات إنزيمية محوّلة للنشاء هي (الشكل 1-6):

(1) إنزيمات الأميلاز الداخلية Endoamylases

تكون هذه الإنزيمات قادرة على قطع الروابط الغليكوزيدية ألفا 1-4 الموجودة في الجزء الداخلي من سلسلة الأميلوز أو الأميلوبكتين، ومن أمثلة هذه المجموعة: إنزيم ألفا أميلاز α-amylase. والمنتجات النهائية لعمل الألفا أميلاز هي سكريات عديدة بأطوال متباينة مع دكسترينات Dextrins مكوّنة من سكريات عديدة متفرعة [Pandey et al. 2000, Marc et al. 2002].

(2) إنزيمات أميلاز خارجية Exoamylases

تقطع إنزيمات هذه المجموعة إمّا الروابط الغليكوزيدية ألفا 1-4، مثل: β-amylase فقط، وإما تقطع كلا نوعي الروابط الغليكوزيدية ألفا 1-4 و ألفا 1-6، مثل: إنزيم Amyloglucosidase، وتعمل هذه الإنزيمات على بقايا الغلوكوز الخارجية External glucose residues من جزيء الأميلاز والأميلوبكتين، وبالتالي تنتج الغلوكوز فقط أو المالتوز و الديكسترين [Pandey et al. 2000].

(3) إنزيمات مزيلة للتفرع Debarching enzymes

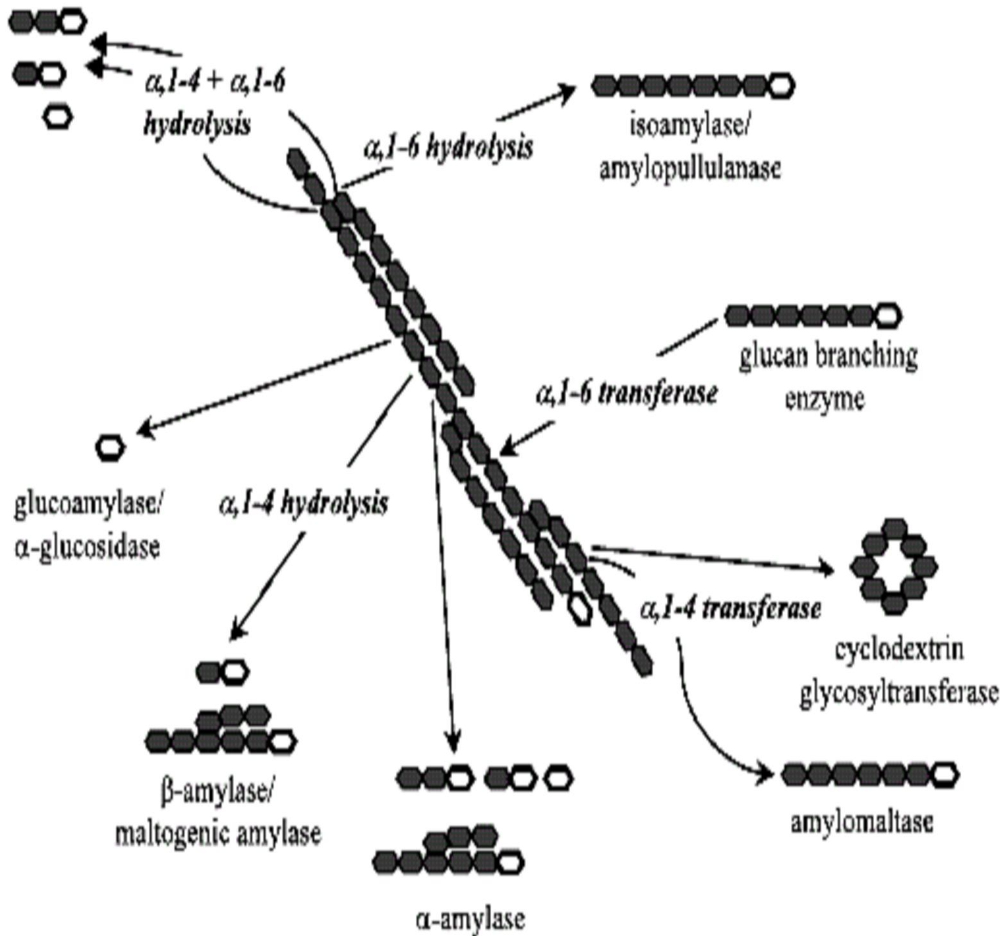
تحلمه إنزيمات هذه المجموعة الروابط الغليكوزيدية ألفا 1-6، مثل إنزيم Isoamylase، تفكك هذه الإنزيمات الأميلوبكتين فقط، وبالتالي تنتج سكريات عديدة خطية [Marc et al. 2002].

(4) إنزيمات ناقلة Transferases

تقطع إنزيمات هذه المجموعة رابطة غليكوزيدية ألفا 1-4 من الجزيء المانح، وتنقل الجزء الممنوح إلى مستقبل غليكوزيدي مع تكوين رابطة غليكوزيدية جديدة، مثل: إنزيم Amylomaltase.

وازداد الاهتمام باستعمال إنزيمات الأميلاز منذ أن اكتشف فوغارتي Fogarty وزملاؤه، في قسم الميكروبيولوجيا الصناعية في جامعة دبلن، إنزيمات الأميلاز التي تنتجها الأحياء الدقيقة [زهران وبريشة

2006]، وفي هذه الأيام أصبح استعمال إنزيمات الأميلازمنتشراً في تطبيقات صناعيةٍ مختلفة، والألفا أميلاز أكثرها انتشاراً واستعمالاً [Marc et al. 2002].



الشكل 1−6 الإنزيمات الداخلة في تفكيك النشاء

حادي عشر. إنزيم ألفا أميلاز α-amylase (E.C.3-2-1-1)

هو إنزيم يهاجم الروابط الغليكوزيدية ألفا 1−4 (α-1,4) في جزيء الأميلوز والأميلوبكتين والغليكوجين، ويحلمهها، ولكنه لا يهاجم الروابط الغليكوزيدية ألفا 1−6 (α-1,6) في تفرعات النشاء، وتعتمد خواص و آلية عمل إنزيمات الأميلاز على مصدر الإنزيم، وتؤثر جميعها مباشرة في التركيب الداخلي لجزيء النشاء، ولذلك فإن مهاجمتها للنشاء يؤدي إلى انخفاض سريع في لزوجة محلول النشاء، وإلى انخفاض سريع في تفاعل هذا المحلول مع اليود مما يدل على التحلل السريع، وينتج عن تحلل الأميلوز سكريات عديدة ذات وزن جزيئي أقل تتراوح بين السكر الثنائي مالتوز إلى عدة سكريات ثنائية مرتبطة معاً، ويعتمد هذا على مصدر الأميلاز وطبيعته، بينما ينتج عن تحلل الأميلوبكتين غلوكوز

ومالتوز ومجموعات مختلفة من الدكسترينات المتفرعة التي ما زالت تحتوي الروابط الغليكوزيدية ألفا 1−6 (α-1,6) التي كانت توجد في مادة النشاء الأصلية [زهران وبريشة 2006].

وقد أنتج إنزيم α-amylase من العديد من الفطريات والخمائر والجراثيم والشعاعيات Actinomycetes، لكن الإنزيمات من مصادر جرثومية وفطرية سادت في التطبيقات المختلفة في القطاعات الصناعية [Pandey et al. 2000].

تستعمل سلالات من الجنس *Bacillus* لإنتاج ألفا أميلاز α-Amylase تجارياً، حيث أُنتجت أنماط الأميلاز الجرثومية المستعملة بغزارة من الأنواع [Bessler et al. 2003]:

Bacillus amyloliquefaciens

Bacillus licheniformis

Bacillus stearothermophilus

ويحتل الإنزيم المنتج من النوع *B. licheniformis* المرتبة الأولى في السوق العالمية لإنزيم ألفا أميلاز نظراً إلى خواصه حيث يتمتع بنشاط عال في تحليل النشاء في درجة حرارة 105 – 110°م، وله مدى واسع من الرقم الهيدروجيني يبقى ثابتاً ونشطاً فيه [زهران وبريشة 2006].

ثاني عشر. التطبيقات الصناعية للألفا أميلاز

Industrial applications of α-Amylase

(1) الإنتاج الصناعي للغلوكوز والفركتوز من النشاء

استبدلت الحلمهة الحمضية حديثاً بالمعاملة الإنزيمية باستعمال ثلاثة أو أربعة إنزيمات للحصول على محاليل غلوكوز وفركتوز عالية التركيز [Crabb and Shetty 1999]، ففي الخطوة الأولى تُسال Liquefy النشاء، ويستعمل إنزيم ألفا أميلاز في هذه العملية، ثم في الخطوة التالية يجرى التحويل السكري Saccharification لمحلول النشاء المحلمه إلى محلول غلوكوز عالي التركيز (أكثر من 95% غلوكوز)، ويستعمل في هذه الخطوة الغلوكوأميلاز Glucoamylase، والخطوة الثالثة في العملية الصناعية للنشاء هي تحويل محلول الغلوكوز إلى محلول الفركتوز المركز الذي يفوق حلاوة محلول الغلوكوز مرتين، ويستعمل إنزيم Glucose isomerise في هذه الخطوة [Marc et al. 2002].

(2) الخبز والحفاظ على المذاق مدة أطول Bakery and anti-staling

تعدّ صناعة الخبز مستهلكاً كبيراً لإنزيمات النشاء، حيث يضاف الألفا أميلاز خلال مرحلة تحضير العجينة لتفكيك النشاء المخرّب Damaged starch في الطحين إلى دكسترينات صغيرة تخمَّر بوساطة الخميرة Yeast المضافة إلى العجين، وبالتالي تؤدي إضافة الألفا أميلاز إلى إنتاج جزيئات قابلة للتخمير، مما يزيد حجم رغيف الخبز، ويجعله أكثر تماسكاً، كما أن الألفا أميلاز يمتلك تأثيراً في الحفاظ على المذاق في الخبز [Shalstrom 1997, Marc et al. 2002].

(3) تكوين الغليكوديكسترين/الغليكوأميلوز Cyclodextrin/Cycloamylose formation

الغليكوديكسترينات سكريات عديدة حلقية مؤلفة من 6 أو 7 أو 8 جزيئات غلوكوز ترتبط بروابط ألفا 1−4 ويكون داخلُ الحلقة كارهاً للماء Hydrophobic (غير قطبي) وخارجها أليفاً للماء Hydrophilic، وهذا يجعلها قادرة على تكوين معقدات مع جزيئات أخرى متنوعة غير أليفة للماء، وهذه المعقدات تؤدي إلى تغير الصفات الفيزيائية لهذه الجزيئات المنضمة إلى جزيئات الغليكوديكسترين، مثل: ثباتية المركبات الحساسة للأكسجين والضوء، وتحسين الانحلالية والطعم والرائحة، أو تحويل المركبات السائلة إلى بودرة.و هذه الخصائص للمركبات المغلفةأدّت إلى تطبيقات متنوعة للغليكوديكسترينات في الكيمياء التحليلية والزراعة والتقانة الحيوية والصناعة الصيدلانية والصناعات الغذائية وصناعة مستحضرات التجميل. و من أجل الإنتاج الصناعي للغليكوديكسترينات تُسال النشاء كخطوة أولى باستعمال إنزيمألفا أميلاز ثابت حرارياً Heat-stable α-amylase ثم إنزيم cyclodextrin glycosyltransferase الذي يُنتجُه النوع *Bacillus macerans* [Riisgaard 1990, Marc et al. 2002].

(4) تطبيقات أخرى Miscellaneous applications

إضافة إلى استعمال الألفا أميلاز في التحويل السكري Saccharification أو إسالة النشاء liquefaction of starch، فقد استعمل في تطبيقات أخرى منها [Marc et al. 2002]:

- تحضير محاليل النشاء الثابتة الدبقة Viscous stable starch solutions المستعملة في تغرية الألياف النسيجية المفتولة للحفاظ على شكلها.
- الحصول على عصائر فواكه رائقة Clarification of fruit juices.
- معالجة أطعمة الحيوانات لتحسين قابلية هضمها.
- الدخول في تركيب مساحيق تنظيف الملابس والأواني والبورسلان.

ثالث عشر. تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في فعالية الألفا أميلاز
Effect of temperature and pH on α-amylase activity

تتأثر التفاعلات الإنزيمية كغيرها من التفاعلات الكيميائية بدرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل،فلكل إنزيمٍ درجة حرارة مثلى، وتزداد سرعة التفاعل بارتفاع درجة الحرارة حتى تصل حرارة التفاعل إلى درجة الحرارة الفضلى Optimum temperature التي تكون سرعة التفاعل عندها أعلى ما يمكن، ثم تنخفض سرعة التفاعل تدريجياً عند زيادة أو انخفاض درجة الحرارة عن الدرجة الفضلى، لأن زيادة درجة الحرارة على الدرجة الفضلى تؤدي إلى تخريب الإنزيم، وبالتالي فقدان لنشاءطه، كما أنه لكل إنزيم رقم هيدروجيني أمثل تكون سرعة التفاعل الإنزيمي عنده أعلى ما يمكن، حيث يؤثر الرقم الهيدروجينيفي تشرّد المواقع الفعالة في الإنزيم أو مادة التفاعل مما يؤثر في الارتباط بينهما، وتتصل

سرعة التفاعل إلى أعلى ما يمكن عند رقم هيدروجيني يكون الأفضل Optimum pH وتنخفض الفعالية الإنزيمية عند زيادة أو انخفاض الرقم الهيدروجيني عن الرقم الأفضل، حيث من الممكن أن يعود هذا التأثير إلى تغيرّ تشر د مكونات التفاعل الإنزيمي، وتختلف الإنزيمات في الرقم الهيدروجيني الأفضل لعملها بسبب اختلافها في الحموض الأمينية المكونة لها [زهران وبريشة 2006السّ وّاح 2002، Biesebeke et al. 2005].

والجدول 1-8 يبين خصائص بعض إنزيمات الألفا أميلاز الجرثومية المنتجة بوساطة جراثيم جنس الباسيلوس [زهران وبريشة 2006].

الجدول1-8 خصائص بعض إنزيمات الألفا أميلاز الجرثومية المنتجة من الباسيلوس

النوع	الرقم الهيدروجيني الأمثل	درجة الحرارة المثلى °م	الوزن الجزيئي (ك.د)
Bacillus acidocaldarius	3.5	75	68
B.amyloliquefaciens	5.9	65	49
B.caldolyticus	5.4	70	-
B.coagulans	8.5 – 7.5	85	-
B.licheniformis	8 – 5	76	22.5
B.stearothemophilus	6.1 – 5.4	70	53
B.sp NRRLB 3881	9.2	50	-
B.sp	6 – 5	70	-
B.subitilus	6.4 – 5.3	50	47
B.subitilus NRRB 3411	7 - 6	70	50

الفصل الثاني

المواد والطرائق

Materials & Methods

أولاً. المواد المستعملة Materials

كانت الأوساط المستعملة في هذه الدراسة إما جاهزة تم تحضيرها وفق تعليمات الشركة المصنعة، أو تركيبية تم تحضيرها وفق المراجع: [السلامة وزيد 2005، Claus & Berkeley 1986, Cappuccino 2001].

1. وسط الآغار المغذي Nutrient Agar

ببتون 5 غ/ل

مستخلص اللحم 1.5 غ/ل

مستخلص خميرة 1.5غ/ل

كلور الصوديوم 5 غ/ل

آغار 15 غ/ل

يستعمل الوسط لتنمية العزلات الجرثومية، وحفظها، وحساب العدد الكلي Plate Count.

2. وسط المرق المغذي Nutrient Broth

ببتون 5 غ/ل

مستخلص اللحم 3 غ/ل

3. وسط دراسة الصفات المظهرية للعزلات Morphological tests

آغار مغذي 5 غ/ل

آغار 5 غ/ل

غلوكوز 0.5 غ/ل

كبريتات المنغنيز $MnSO_4$ 0.03 غ/ل

الرقم الهدروجيني pH 7

تعقيم الوسط بالمعقمة 121 ْم، مدة 15 دقيقة

4. وسط اختبار الحركة Motility test

مرق مغذ

آغار 0.3%

وزيع في أنابيب اختبار

تعقيم الوسط بالمعقمة 121 ْم، مدة 15 دقيقة

5. وسط Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

منقوع من دماغ العجل infusion from calf brain 200 غ/ل

منقوع من قلب العجل 250غ/ل

ببتون 10غ/ل

ديكستروز 2غ/ل

كلوريد الصوديوم 5غ/ل

فوسفات ثنائية الصوديوم 5غ/ل

آغار 1غ/ل

pH 7.4

تحضير الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة

توزيع في أنابيب

تعقيم الوسط بالمعقمة 121ْم، مدة 15 دقيقة

6. وسط Sabouraud dextrose Agar (pH 6.8 و pH 5.8)

ببتون 10غ/ل

دكستروز 20 غ/ل

آغار 20غ/ل

الرقم الهدروجيني pH 6.8 و 5.8

توزيع كل منها في أنابيب

تعقيم الوسط بالمعقمة 121ْم، مدة 15 دقيقة

وضع الأنابيب بشكل مائل

7. وسط النمو فيتركيز ات ملحية مختلفة من كلور الصوديوم NaCl

الآغار المغذي 2.8%

مضافاً إليه تركيز ات مختلفة من كلور الصوديوم 2%،5%،7%،10%.

توزيع الوسط في أنابيب

تعقيم الوسط بالمعقمة 121ْم، مدة 15 دقيقة

توضع بعد انتهاء التعقيم بشكل مائل للحصول على أنابيب مائلة

8. وسط استهلاك السترات Simmon's citrate Agar

كلور الصوديوم 5 غ/ل

كبريتات المغنزيوم المائي $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 غ/ل

فوسفات الأمونيوم ثنائية الهيدروجين $NH_4H_2PO_4$ 1 غ/ل

فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين K_2HPO_4 1 غ/ل

سيترات الصوديوم 2 غ/ل

آغار 15غ/ل

تذاب جميع المكونات

الرقم الهدروجيني pH 6.8

ثم يضاف 0.08 غ/ل مشعر أزرق بروموتيمول Bromothymol blue

توزيع الوسط في أنابيب

تعقيم الوسط بالمعقمة 121°م، مدة 15 دقيقة

وضع بشكل مائل

9. وسط مرق تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation Broth

تريبتون Tryptone 10 غ/ل

كلور الصوديوم Sodium chloride 5 غ/ل

أزرق بروموتيمول Bromothymol blue 2.5 مل/ل

تضاف جميع المكونات إلى الماء عدا المشعر ثم تذاب

الرقم الهدروجيني 7.2

ثم يضاف المشعر، ويوزع الوسط في أنابيب ذات غطاء بمعدل 5 مل/أنبوب

إدخال أنبوبة درهام مقلوبة داخل الأنبوب

التعقيم في الدرجة 121° م مدة 20 دقيقة

يتم تحضير السكر المطلوب إضافته بتركيز 10%:

(غلوكوز، أرابينوز،زيلوز، مانيتول، غالاكتوز،

فركتوز، سوربيتول، لاكتوز، سيلوبيوز، سكروز)

تعقيم بالترشيح

إضافة السكر المعقم بمعدل 0.5 مل/5 مل وسط

الحصول على تركيز نهائي 1%

10. وسط Phenol red Dextrose Broth

كازئين casein 10 غ/ل

كلور الصوديوم Sodium chloride 5 غ/ل

ديكستروز 5 غ/ل

أحمر فينول Phenol red 0.018 غ

حل الوسط

توزيع في أنابيب الاختبار

إضافة أنابيب درهام Durham

تعقيم بالدرجة 118° م مدة 15 دقيقة

11. وسط Phenol red Lactose Broth

كازئين casein 10غ/ل

كلور الصوديوم Sodium chloride 5 غ/ل

لاكتوز 5 غ/ل

أحمر فينول Phenol red 0.018 غ

حل الوسط

توزيع في أنابيب الاختبار

إضافة أنابيب دورهام Durham

تعقيم بالدرجة 118° م مدة 15 دقيقة

12. وسط مرق التيوغليكولات Thioglycolate Broth

مستخلص الخميرة 5 غ/ل

تربتون 15غ/ل

غلوكوز 5.5 غ/ل

تيوغليكولات الصوديوم 0.5 غ/ل

كلور الصوديوم 2.5 غ/ل

سيستين 0.5 غ/ل

ريزازورين 0.001 غ/ل

آغار 0.5 غ

يستعمل هذا الوسط لتنمية الجراثيم اللاهوائية، ويحضر بإذابة مقدار 29.8 غ من الوسط الجاف في 1 لتر من الماء المقطر

تسخين حتى الغليان

ثم توزيع في أنابيب الاختبار

تعقيم الوسط بالمعقمة 121ْ م، مدة 15 دقيقة.

13. وسط آغار بالحديد الثلاثي السكر (TSI) Triple sugar iron Agar

المواد الغذائية الضرورية

إضافة إلى أحمر فينول Phenol red ككاشف للرقم الهيدروجيني

اللاكتوز والسكروز والغلوكوز

كبريتات الحديد Ferrous sulphate

تيوسلفات الصوديوم Sodium thiosulfate ككاشف لكبريت الهيدروجين H_2S

يمكن تحديد قدرة الكائن على تخمر سكر اللاكتوز والسكروز والغلوكوز مع تكوين الحموض والغازات

و يمكن الكشف عن مقدرة الجراثيم على تكوين غاز H_2S

يحضر في أنابيب مائلة

14. وسط مرق أحمر الميتيل – فوجس بروسكور MR-VP Broth

ببتون 7 غ/ل

ديكستروز 5 غ/ل

بوتاسيوم فوسفات 5غ/ل

حل جميع المكونات

الرقم الهدروجيني pH 6.9

توز يع في أنابيب الاختبار

تعقيم بالدرجة 121ْ م مدة 15 دقيقة

15. وسط الهلام المغذي Nutrient gelatine

هلام 120غ/لمرق مغذٍ

الرقم الهدروجيني 6.7

إضافة الهلام إلى المرق المغذي

إذابة في حمام مائي

توز يع في أنابيب بوضع رأسي

تعقيم الوسط بالمعقمة 121ْ م، مدة 15 دقيقة

16. وسط SIM medium

إضافة 30 غ/ل ماء مقطر مع التسخين في حمام مائي بدرجة الغليان

توزيع في أنابيب الاختبار بمقدار 4 سم

تعقيم في الدرجة 121ْ م مدة 15 دقيقة

تصليب الآغار بوضع رأسي

17. وسط Litmus milk Broth

مسحوق skim milk powder 100غ

0.5 Litmus غ

كبريتيت الصوديوم 0.5غ

الرقم الهيدروجيني النهائي 6.8

حل 101غ من الوسط الجاهز في 1 ل ماء مقطر بالتحريك الجيد

توزيع بمقدار 10 مل لكل أنبوب (15×150مم)

تعقيم بالدرجة 121ْ م مدة 5 دقائق

18. وسط Urea Broth

خلاصة الخميرة yeast extract 0.1غ/ل

فوسفات أحادي البوتاسيوم monopotasium phosphate 9.1 غ/ل

فوسفات ثنائية البوتاسيوم dipotasium phosphate 9.5غ/ل

البولة uria 20غ/ل

أحمر الفينول phenol red 0.01غ/ل

تعقيم بالترشيح

توزيع في أنابيب الاختبار

19. وسط آغار نشاء Starch Agar

آغار مغذٍ

نشاء بطاطا منحل 2 غ/ل

20. وسط إنتاج الإنزيم [Ashraf 2004]

نشاء starch 0.2%

ببتون peptone 0.5%

مستخلص اللحم beef extract 0.3%

حل المكونات السابقة في وقاء الفوسفات 0.02 مول

توزيع الوسط بمقدار 20 مل في دوارق 100 مل

إغلاق الدوارق بسدادات قطنية محكمة

تعقيم بالمعقمة 121ْ م مدة 5 دقيقة

21. الصاد الفطري نيستاتين Nystatin

إضافة إلى الوسط بنسبة 50 ملغ/ ل

22. تترامیتیل بارا–فينيلين ثنائي أمين ثنائي هيدروكلور 1%

كاشف عن إنتاج الأكسيداز

23. أحمر الميتيل

كاشف يستعمل لمعرفة فيما إذا كانت الجر اثيم قادرة على تخمير الغلوكوز مع إنتاج كمية كافية من الحمض لخفض الرقم الهيدروجيني pH إلى 4 - 4.5.

24. كاشف كوفاك Kovac's

كاشف عن الإندول

25. محلول لوغول

يود 1غ

يود البوتاسيوم 2 غ

ماء مقطر 300 مل

26. صبغة غرام Gram stain

صبغة بنفسجي كريستال Crystal violet stain

محلول يود غرام Gram's iodine

كحول إيتيلي 96%

صبغة السفرانين Safranine stain.

27. ملونات الأبواغ الداخلية Staining bacterial endospores

محلول أخضر ملاكيت 5% Malachite green solution

محلول السفرانين 0.5% Safranine solution

28. إنزيم ألفا–أميلاز Alpha-amylase قياسي

من شركة serva من الفطر *Aspergillus oryzae*

بودرة معايرة مختبرة للاستعمال في المختبر

الفعالية 5 وحدة/ملغ

الانحلالية 1ملغ/مل

29. مواد معايرة الإنزيم

(1) نشاء منحل soluble starch محلول 1%

(2) غلوكوز glucose محلول بتركيز 0.18% يحضر منه تراكيز ات مختلفة

(3) كاشف DNS المكون من:

ماءات الصوديوم NaOH 10غ/ل، حمض ثنائي نتروسالسيليك

dinitrosalicylic acid 10غ/ل، فينول phenol 2غ/ل

(4) عند الاستعمال يضاف إليه:

طرطر ات الصوديوم والبوتاسيوم $NaK (COO)_2(CHOH)_2.4H_2O$ 20 غ/100 مل

وكبريتيت الصوديوم NaSO3 0.05غ/100مل

(5) وقاء الأسيتات acetate buffer 0.1 مول (pH=5.0)

30. مواد معايرة البروتين

(1) ثلاثي حمض الخل Trichloracetic acid (TCA) تركيز 50%

(2) ماءات الصوديوم NaOH 0.1 نظامي

(3) محلول A: كربونات الصوديوم $NaCO_3$ 30 غ + NaOH 4 غ تحل في 1 ل ماء مقطر

(4) محلول B: كبريتات النحاس $CuSO_4$ 20 غ/ل ماء مقطر

(5) محلول C: محلول 2% طرطر ات الصوديوم والبوتاسيوم في الماء المقطر

(6) محلول D: محلول فولن ممدد 3 مرات

(7) ألبومين مصل البقر bovine serum albumin

31. وقاء الفوسفات (0.2 مول) phosphate buffer (pH=7)

فوسفات البوتاسيوم الأحادية KH2PO4 1.23 غ

فوسفات الصوديوم الثنائية Na_2HPO_4 1.97 غ

حل في 100 مل ماء مقطر، بعد ذلك إضافة 65 مل من محلول NaCl 0.9%

إتمام الحجم بالماء المقطر إلى 1000 مل

ثانياً . طرائق البحث Methods

1. اختيار مواقع الدراسة Select of study sites

تحيط غوطة دمشق بالعاصمة دمشق من الشرق والجنوب والغرب، وهي واقعة ضمن مدينة دمشق وريفها، وتبدأ الغوطة الغربية و الغوطة الجنوبية من خانق الربوة فالمزة وداريا إلى صحنايا والأشرفية ثم سبينة، أما الغوطة الشرقية فتمتد بين جرمانا وكفر بطنا والمليحة وعربين وحرستا ودوما، وتشتهر الغوطة بزرع الأشجار المثمرة والخضار الصيفية والقمح، وتروى من فروع نهر بردى.

جمعت عينات التربة من غوطة دمشق من أربعة مواقع مختارة وفق خطة البحث، وهي: داريا، يلدا، دير العصافير، ناالشّبيّ ة،وقد جمعت العينات من كل موقع بطريقة خطية بفارق مسافات تر اوحت بين 200 – 500 متر، بحيث نحصل على مجموعة من العينات تكون ممثلة للموقع.

2. جمع عينات التربة Collection of Soil Samples

كثيراً ما تعطي الطرائق القياسية المستعملة في تقدير الأعداد الحية للأحياء الدقيقة في التربة نتائج متباينة، وترجع الأخطاء الناتجة إلى طريقة أخذ عينات التربة وتجهيزها التي كثيراً ما تعطي اختلافاً في النتائج تفوق الاختلافات الناشئة عن طريقة التقدير ذاتها، ويمكن التغلب على هذه المشكلة إلى حد ما بأخذ عينات كثيرة من مواقع مختلفة في الحقل وخلطها لتحضير عينات مركبة تكون أكثر تمثيلاً للواقع [حمد 2005].

وقد جمعت العينات من مواقع الدراسة من عمق 2 – 20 سم تحت سطح التربة،و استعمل لجمع العينات أدوات معدنية خاصة للحفر والتعبئة، ووضعت كل عينة في كيس بلاستيكي، وقبل أخذ العينة التالية كانت تعقم أداة الاعتيان shovel بالكحول 95% والتلهيب (الشكل 2–1) [Meiying Gao et al. 2008].

1.2. <u>عينات موقع داريا</u>

جمعت العينات في 2008/7/12 من المنطقة الشرقّ ة من داريا بين داريا وكفرسوسة، وفق الآتي:

- عينة تربة جافة بلون بني فاتح من مزرعة زيتون.
- عينة تربة جافة بلون بني فاتح من مزرعة زيتون.
- عينة تربة جافة بلون بني فاتح من مزرعة زيتون.
- عينة تربة جافة بلون بني فاتح من مزرعة جوز.
- عينة تربة جافة بلون بني فاتح من مزرعة زيتون.
- عينة تربة رطبة بلون بني من مزرعة محاصيل ذرة.
- عينة تربة رطبة بلون بني من مزرعة حبق.
- عينة تربة رطبة بلون بني من مزرعة بقلة.
- عينة تربة رطبة بلون بني من مزرعة ملوخية.

– عينة تربة رطبة بلون بني من مزرعة باذنجان.

أخذت العينات إلى المختبر، وتم تحضير مزيج من العينات العشر ضمن الحجرة العقيمة حيث أخذ من كل عينة بعد مجانستها 100غ للحصول على ممثل للموقع المدروس 1000 غ.

2.2. عينات موقع يلدا

جمعت العينات في 2008/7/19 من بلدة يلدا، على عمق 2 – 20 سم بعد إزالة الطبقة السطحية (نحو 2 سم)، وفق الآتي:

- عينة تربة بلون بني من مزرعة فصة.
- عينة تربة بلون بني من مزرعة فصة.
- عينة تربة بلون بني من مزرعة ذرة.
- عينة تربة بلون بني من مزرعة باذنجان.
- عينة تربة بلون بني من مزرعة ملوخية.

أخذت العينات إلى المختبر، وتم تحضير مزيج من العينات الخمس ضمن الحجرة العقيمة حيث أخذ من كل عينة بعد مجانستها 100 غ للحصول على ممثل للموقع المدروس 500 غ.

3.2. عينات موقع دير العصافير

جمعت العينات في 2008/7/19 من بلدة دير العصافير، من عمق 2 – 20 سم بعد إزالة الطبقة السطحية (نحو 2 سم)، وفق الآتي:

- عينة تربة بلون بني من مزرعة زيتون.
- عينة تربة بلون بني من مزرعة حور.
- عينة تربة بلون بني من مزرعة حور.
- عينة تربة بلون بني من مزرعة جوز.
- عينة تربة بلون بني من مزرعة جوز.

تم تحضير مزيج من العينات الخمس ضمن الحجرة العقيمة، حيث أخذ من كل عينة بعد مجانستها 100 غ لنحصل على ممثل للموقع المدروس 500 غ.

4.2. عينات موقع الشّابيّة

جمعت العينات في 2008/7/19 من بلدة الشّابيّة، من عمق 2 – 20 سم بعد إزالة الطبقة السطحية (نحو 2 سم)، وفق الآتي:

- عينة تربة بلون بني من مزرعة فصة.

– عينة تربة بلون بني منمزر عة فصة.

– عينة تربة بلون بني منمزر عة إجاص.

– عينة تربة بلون بني منمزر عة إجاص.

– عينة تربة بلون بني من مزرعة إجاص.

تم تحضير مزيج من العينات الخمس ضمن الحجرة العقيمة، حيث أخذ من كل عينة بعد مجانستها 100 غ للحصول على ممثل للموقع المدروس 500 غ.



الشكل 2-1 جمع عينات التربة

3. حساب الوزن الجاف للتربة Collection of soil dry weight

استعمل 10 غ من عينة التربة لتحديد الرطوبة في العينة، من خلال التجفيف فيالفرن حرار ته 103ْم حتى ثبات الوزن، وحسبت أعداد المستعمرات فيما بعد نسبة للوزن الجاف للتربة [Egdell et al. 1960, Lester H.1982].

4. عزل جراثيم الباسيلوس وتقدير نسبتها *Bacillus* isolation

لحساب العدد الكلي للجراثيم في كل عينة من العينات الممثلة للمواقع المدروسة يضاف 10 غ من عينة التربة إلى 90 مل ماء ملحي معقم (NaCl 0.85%) وتحرك حتى الحصول على محلول متجانس لعينة التربة [Amoa-Awua et al. 2005]، ثم يحضر من هذا المحلول تمديدات من 10^{-2} – 10^{-6}، ويؤخذ من كل تمديد 0.1 مل ويزرع بنشره بوساطة الماسحة الزجاجية على أطباق الآغار المغذي (المضاف إليها الصاد الفطري نيستاتين Nystatin بنسبة 50 ملغ/ ل) ثلاثة مكررات لكل تمديد.

ولحساب أعداد الباسيلوس (التي تتميز أبواغها بمقاومتها العالية للحرارة) يعرّض محلول التربة المحضر سابقاً لصدمة حرارية بوضعه في حمام مائي درجة حرارته 80 ْم مدة 10 دقائق لقتل الخلايا الإعاشيّة، ثم يبرّد، ويحضّر منه تمديدات من 10^{-2} – 10^{-6}، ويؤخذ من كل تمديد 0.1 مل وتزرع بنشرها بوساطة الماسحة الزجاجية المعقمة على أطباق الآغار المغذي، وتحضن الأطباق هوائياً في درجة الحرارة 30 ْم مدة 48 ساعة [Amoa-Awua et al. 2005]، وبعد انتهاء الحضانة تعدُّ المستعمرات النامية على الوسط.

العدد الكلي للمستعمرات في غ/ تربة جافة = عدد المستعمرات على الطبق × معامل التمديد

عدد مستعمرات الباسيلوس في غ/ تربة جافة = عدد المستعمرات على الطبق × معامل التمديد

نسبة الباسيلوس في كل عينة = عدد المستعمرات للباسيلوس/ العدد الكلي للأنواع × 100

تعتمد الخطوة الأولى في دراسة الأحياء الدقيقة على عزل Isolation هذه الأحياء الدقيقة بحيث يمكن الحصول عليها منفردة عن غيرها ونقية، وتدعى المزرعة النّقية Pure culture، وهي مهمة لتجنب الأخطاء في عملية التشخيص [Maheshwari et al. 2000]، وتسمى هذه المزرعة النقية بالعزلة Isolate ريثما يتم تحديد هويتها على مستوى الجنس والنوع من خلال الدراسة المظهرية والفيزيولوجية والوراثية [Kim et al. 2002, Saintpierre et al. 2003, He et al. 2005]، وإذا أظهرت عزلتان نقيتان تنتميان إلى النوع نفسه تبايناً في صفة معينة، وكانت هذه الصفة أكثر وضوحاً في إحداهما مقارنة بالأخرى توجب تسميتهما سلالتين Strains [Watanab 2002].

لوحظت المستعمرات النامية على أطباق الآغار المغذي التي استزرعت عليها العينات المعرّضة لصدمة حرارية (درجة حرارة 80ْم مدة 10 دقائق) وعزلت المستعمرات المتباينة من حيث الشكل واللون والحجم على أطباق جديدة، ثم أعيد استزراعها لتنقيتها بطريقة الزرع المتتالي على أطباق الآغار حتى الحصول على مستعمرات مفردة نقية للعزلات.

5. حفظ العزلات Isolates Maintenance

حفظت العزلات على الآغار المغذي المائل في درجة حرارة 4ْ م، كما حفظت في الغليسيرول 15% في درجة الحرارة -20ْ م [Arindam et al. 2007, Saban et al. 2007, Dharani 2004].

6. دراسة بعض الصفات العامة للعزلات

درس بعض الصفات العامة التي تميز الجنس *Bacillus*: شكل المستعمرات، ولونها، وتلونها بصبغة غرام، تفاعل الكاتلاز، و الاحتياجات من الأكسجين الجوي.

1.6. الصفات الشكلية والمجهرية للعزلات

درست المستعمرات النامية من حيث الشكل والحجم واللون والحواف، كما تم فحص الخلايا من مستعمرات فتية عمرها 18 - 24 ساعة وتلونها بصبغة غرام حيث تم تحضير الغشاء الجرثومي لكل عزلة من المزارع الجرثومية حديثة النمو، وأجريت خطوات التلوين بحسب تعليمات شركة Merk كما لو ّنت الأبواغ الداخلية من مزارع جرثومية عمرها 48 - 72 ساعة بحسب طريقة فولتون Schaeffer-Fulton [Cappuccino 2001, Claus and Berkeley, 1986].

2.6. الكشف عن الكاتلاز Catalase test

أُجري اختبار الكاتلاز Catalase test بأخذ القليل من خلايا المستعمرة بوساطة إبرة الزرع ووضعها في طبق بتري نظيف، ثم إضافة فوقها نقطتين إلى ثلاث نقاط من فوق أكسيد الهيدروجين 3% (H_2O_2) ومزجها جيداً، يدل وجود فقاعات هوائية على انطلاق الأكسجين وبالتالي على إيجابية اختبار الكاتلاز وإلا فالاختبار يكون سلبياً [السلامة وزيد 2005].

$$2H_2O_2 + \text{Catalase} \longrightarrow 2H_2O + O_2 \nearrow$$

3.6. اختبار الاحتياجات للأكسجين Oxygen Requirements

استزرعت العزلات من مزارعها الفتية (24 ساعة مزرعة مرق مغذ لكل عزلة) بأخذ نحو 20 ميكروليتراً من المزرعة، وحقنها في أنابيب وسط الاختبار brain-heart infusion Agar deep tubes (BHIA)، حيث يتم تمييع الآغار بالغلي في حمام مائي، ثم تبريده إلى الدرجة 45ْ م، يحقن الأنبوب بقطرتين من المزرعة (20 ميكروليتراً)، ومزجه، ثم تبريده بسرعة، فحضنه في الدرجة 37ْ م مدة 24 - 48 ساعة، وتكون النتيجة بحسب مكان النمو، وتوزعه في الأنبوب كما يلي [Cappuccino 2001]:

– هوائية Aerobic: يتطلب نموها وجود الأكسجين، ويلاحظ النمو على السطح.

– أليفة قلة الأكسجين Microaerophilic: يتطلب نموها كميات محدودة من الأكسجين، ويلاحظ النمو على السطح وتحت السطح مباشرة.

– لاهوائية اختيارياً Facultative anaerobic: يمكنها النمو في وجود الأكسجين أو غيابه، ويتوزع النمو في الأنبوب وبشكل أكثف في الأعلى.

– لاهوائية متحملة للأكسجين Aerotolerant anaerobic: يتوزع النمو في الأنبوب توزعاً متساوياً.

- لا هوائية إجبارياً Obligate anaerobic: يكون النمو في أسفل الأنبوب فقط.

7. غربلة العزلات المنتجة للأميلاز (الغربلة الأولية) Screening of amylase producing isolates

عند نمو الأحياء الدقيقة على وسط صلب فإن الإنزيمات الخارجية تنتشر خلال الآغار حول المستعمرةوا ٍذا اشتمل الوسط على المادة الأولية (المداد) الخاصة بالإنزيم فإنه يمكن تحديد نشاط الإنزيم من خلال ظهور مناطق متحللة في المادة الأولية. وفي حالة الألفا أميلاز (حيث تكون المادة الأولية النشاء والكاشف هو اليود) تظهر هالة رائقة حول المستعمرة المنتجة للإنزيم [السلامة وزيد 2005 ,Cappuccino and Sherman 2001]، وقد تمت عملية الغربلة وفق الخطوات الآتية:

1.7. زرع العزلة في المرق المغذي مدة 24 – 48 ساعة.

2.7. زرع 10ميكروليتر ات من المرق المغذي لكل عزلة في مركز طبق آغار النشاء.

3.7. حضن الأطباق في الدرجة 37ْ م مدة 48 ساعة.

4.7. بعد انتهاء الحضن يغمر الطبق بمحلول لوغول.

5.7. تحديد كفاءة العزلات في إنتاج الأميلاز بحساب المعدل بين قطر الهالة الشفافة (Clear Zone: CZ) وقطر منطقة النمو (Growth Zone: GZ)، إذ إن كفاءة العزلة تساوي نسبة قطر الهالة الشفافة إلى قطر منطقة النمو (الشكل1-2) [Gupta et al. 2003]، واختيرت العزلات ذات الكفاءة العالية التي أعطت قيم كفاءة أعلى من 2.5لاستزراعها في الوسط السائل لإنتاج الإنزيم وتقييم إنتاجها كمياً .



الشكل 2-2 الهالة الشفافة المكوّنة حول المستعمرة المنتجة للأميلاز عند غمر الطبق بمحلول لوغول.

8. الغربلة الكمية Quantitative Screening

اختير ت العزلات التي أعطت أعلى نسبة تحلل للنشاء،وحقن وسط إنتاج الإنزيم بمقدار 2% من اللقاح الجرثومي ذي الكثافة 0.6 عند طول موجة 600 نانومتر بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة، وحضن وسط التخمير في الدرجة 37ْ م ضمن حاضنة هزازة تعمل بسرعة دوران 200 دورة/دقيقة مدة 48 ساعة، وقدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين في المستخلص الإنزيمي الخام [Ashraf 2004].

9. تحضير اللقاح Preparation of inoculum

حضّر وسط المرق المغذي ووزّع بمقدار 10 مل في أنابيب 50مل وعقّم، وزرعت الأنابيب من مستعمرات فتية للعزلات المختارة (عمر ها 24 ساعة)، وحضنت في الدرجة 37 ْ م ضمن حاضنة هزازة

بسرعة دوران 200 دورة/دقيقة، وبعد حضن 18 ساعة قيستالكثافة الضوئية للمعلق الجرثومي عند طول موجة 600 نانومتر، ووحِّدتالتركيز ات للمعلقات الجرثومية للعزلات (بتخفيفها بوساطة المرق المغذي في حال الكثافة المرتفعة) لتكون قيمة الكثافة 0.6.

10. المستخلص الإنزيمي الخام Raw enzymatic extraction

بعد انتهاء مدة التخمير ثقّلت العينات بسرعة 4 آلاف دورة/د مدة 15 دقيقة،و أخذ الطافي منها، وأمكن الحصول على المستخلص الإنزيمي [Ikram-ul-Haq et al. 2005, Rajendra et al. 2007].

11. الاختبارات التشخيصية للعزلات ذات الكفاءة العالية في إنتاج الألفا أميلاز

أجريت بعض الاختباراتلدر اسة الخصائص الحيوية الكيميائية بحسب Claus and Berkeley 1986، إلى جانب دراسة الخصائص الشكلية، واختباري الكاتلاز، و الاحتياجات الهوائية للعزلات التي أعطت أعلى إنتاجية للإنزيم في وسط الإنتاج [Mansour et al. 2008].

1.11 اختبار الحركة Motility test

لُقحت أنابيب وسط اختبار الحركة من مزرعة العزلة بطريقة الوخز في مركز الأنبوب، وحضنت مدة 2-3 أيام في الدرجة 37 ° م، ويدل ظهور ضبابة حول منطقة الوخز على حركة الجراثيم.

2.11 تحديد المدى الحراري لنمو العزلات

لقحت أنابيب الآغار المغذي المائلة من مزارع فتية 24 ساعة، وحضنت في درجات حرارة مختلفة:

55 ° م/60 ° م/65 ° م (لوحظ النمو بعد الحضن 3 أيام)

30 ° م/40 ° م/50 ° م (لوحظ النمو بعد الحضن 5 أيام)

25 ° م (لوحظ النمو بعد الحضن 14يوماً)

5 ° م/10 ° م (لوحظ النمو بعد الحضن 21يوماً)

3.11 نمو العزلات في تركيز ات ملحية مختلفة من NaCl

لقحتأنابيب الآغار المغذي المائلة الحاوية تركيز ات مختلفة من NaCl من مزارع فتية 24 ساعة، وحضنت في الدرجة 37° م، ولوحظ النمو مدة 14يوماً .

4.11 نمو العزلات في pH 6.8 و pH 5.8 على وسط Sabouraud dextrose Agar

لُقحت أنابيب الوسط المائلة من مزارع فتية 24 ساعة، وحضنت في الدرجة 37° م، ولوحظ النمو مدة 14يوماً .

5.11 النمو في ظروف لاهوائية في وسط مرق التيوغليكولات

لقحت الأنابيب الحاوية مرق التيوغليكولات من مزارع فتية 24 ساعة وحُركت بعد وضع اللقاح بلطف لتوزيع النمو على نحو جيد (يؤدي التحريك الشديد إلى زيادة تركيز الأكسجين في الأنبوب)، ثم حضنت في درجة حرارة 37° م مدة 24 ساعة، ولوحظ مكان النمو حيث تكون هوائية إذا حدث النمو في الأعلى، واختيارية إذا حدث النمو في الوسط، ولاهوائية إجبارية إذا حدث النمو في الأسفل.

6.11 الكشف عن القدرة على تخمير بعض السكريات وانتاج الحمض والغاز في وسط مرق تخمر الكربوهيدرات

لقحت الأنابيب الحاوية وسط مرق تخمر السكريات من مزارع فتية 24 ساعة، وحضنت في درجة حرارة 37° م، ولوحظ تغير اللون من الأزرق إلى الأصفر نتيجة تشكل الحمض في حال التخمر الإيجابي، وتنتج الغاز في أنبوب درهام في حال إنتاج الحمض والغاز، كما أجري اختبار سكري الدكستروز واللاكتوز على وسطَي مرق أحمر فينول دكستروز Phenol red Dextrose Broth ومرق أحمر فينول لاكتوز Phenol red Lactose Broth.

7.11 اختبار استعمال السترات

لقحت الأنابيب المائلة لوسط استهلاك السترات Simmon's citrate Agar من مزارع فتية 24 ساعة، وحضنت في درجة حرارة 37° م، ففي الاختبار الإيجابي يتحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق.

8.11 إنتاج الأكسيداز Oxidase

وُضع 2 - 3 قطرات من كاشف تترامثيل بارا- فينيلين ثنائي أمين ثنائي هيدروكلور 1% على سطح ورقة ترشيح واطمان 1 وتوضع في طبق بتري، وأخذ بوساطة إبرة الزرع قليل من المستعمرة الجرثومية،وعُمل غشاء على سطح الورقة المشبعة بالكاشف، وفي الاختبار الإيجابي يظهر لون أرجواني غامق خلال 5 - 10 ثوان.

9.11 اختبار فوجس بروسكور VP test

لقحت الأنابيب الحاوية وسط مرق أحمر الميتيل – فوجس بروسكور MR-VP Broth من مزارع 24 - 72 ساعة، وحضنت في درجة حرارة 37° م مدة 72 ساعة، ثم أخذ 3 مل من المزرعة ووضعت في أنبوب جديد، وأضيف إليه 15 قطرة من الكاشف A (ألفانافتول)، و 5 قطرات من الكاشف B (محلول ماءات البوتاسيوم KOH تركيزه 40%)، ثم مزج بشكل جيد وفحص بعد 5 دقائق، يكون الاختبار إيجابياً عندما تنتج الخلايا أسيتيل ميتيل كربينول، ويستدل على ذلك بوجود لون أحمر وردي.

10.11 اختبار أحمر الميتيل MR test

أُضيفت 5 قطرات من كاشف أحمر الميتيل إلى 3 مل من مزرعة أحمر الميتيل – فوجس بروسكور MR-VP Broth، يدل اللون الأحمر على أن اختبار أحمر الميتيل إيجابي.

11.11 اختبارتخمر الغلوكوز واللاكتوز والسكروز وإنتاج الغاز وكبريت الهيدروجين على وسط الحديد الثلاثي السكر Triple Sugar Iron Agar (TSI)

لُقحت أنابيب الوسط المائلة من مزارع فتية 24 ساعة، وحضنت في الدرجة 37ْ م، ولوحظ التغير في الوسط وفق الجدول 2–1.

الجدول 2–1 التفاعلات على وسط (TSI)

التفاعل	تفسير التفاعل
السطح المائل قلوي (أحمر) العمق حمضي (أصفر)	تخمر الغلوكوز
الوسط حمضي (السطح المائل والعميق)	تخمر اللاكتوز أو السكروز أو كلاهما
فقاعات هوائية في العمق وقد يتشقق الوسط	مزرعة منتجة للغازات
اسوداد العمق، أو العمق والسطحالمائل معاً	إنتاج H_2S
العمق والسطح المائل قلويان (الوسط أحمر)	عدم تخمر أي من السكريات الثلاثة

12.11 إماهة الهلام

لُقحت أنابيب الهلام المغذي بطريقة الوخزبالإبر ة المستقيمة، وحضنت في الدرجة 37ْ م مدة 24 ساعةثم وضعت في الثلاجة مدة نصف ساعة قبل الفحص، في حال كانت الجر اثيم المختبرة منتجة للجيلاتيناز Gelatinase ستعمل على تحليل الهلام (الجيلاتين)، مما يؤدي إلى سيولة الوسط بأشكال مختلفة.

13.11 اختبار إنتاج الإندول Indole production

حُ قن الوسط بطريقة الوخز والحضن في الدرجة 37ْ م مدة 48 ساعة، في حال كانتالجر اثيم المختبرة قادرة على تفكيك الحمض الأميني تريبتوفان Tryptophanوا إنتاج الإندول فإنها تظهر طبقة بلون أحمر فاتح عند إضافة كاشف كوفاكس Kovac's، والتفاعل إيجابي.

14.11 اختبارات Litmus milk reactions

لقحت الأنابيب الحاوية وسط الاختبار بوساطة إبرة الزرع من مزارع فتية عمر 24 ساعة، وحضنت مدة 48 ساعة في حرارة 37 ْم، ولوحظ التغير الذي طرأ على الوسط وسجلت النتيجة:

–تلون الوسط بالكامل يشير إلى تخمر اللاكتوز وا إنتاج الحمض.

– تلون المنطقة العلوية من الوسط بالأحمر الوردي وبقية الأنبوب بالأبيض يشير إلى تكون الحمض يليه الإرجاع.

– تلون المنطقة العلوية من الوسط بالأحمر الوردي وبقية الأنبوب بالأبيض، مع تصلب الجزء السفلي يشير إلى تكون الحمض والإرجاع والتخثر.

– تلون المنطقة العلوية من الوسط بالأحمر الوردي، وبقية الأنبوب بالأبيض مع تشقق في الخثرة يشير إلى تكون الحمض والغاز والإرجاع والخثرة.

– تلون المنطقة العلوية من الوسط بالأرجواني وبقية الأنبوب بالأبيض يدل على إرجاع الليتموس Litmus reduction.

– تلون المنطقة العلوية من الوسط بالأرجواني الغامق، وبقية الأنبوب مسمر نصف شفاف يشبه مصل اللبن يدل على حلمهة البروتين Proteolysis.

–عدم وجود أي تغير أو حدوث تلون للقعر بالأزرق يدل على التفاعل قلوي.

15.11 اختبار تفكيك البولة Urea

لقحت الأنابيب الحاوية وسط مرق البولة Urea Broth بوساطة إبرة الزرع من مزرعة فتيةعمر ها 24 ساعة، وحضنت مدة 48 ساعة في حرارة 37° م، ولوحظ التغير الذي طرأ على الوسط وسجلت النتيجة، حيث يدل اللون الأحمر على سلبية التفاعل، واللون الأحمر الوردي الغامق يدل على إيجابية التفاعل (تفكك البولة).

12. معايرة فعالية الألفا أميلاز α-amylase activity assay

حددت فعالية الألفا أميلاز في المستخلص الإنزيمي وفقاً لطريقة أوكولو ورفاقه Okolo et al. (1995) [Sumitra et al. 2004, Okolo et al.1995]، حيث يتكون مزيج التفاعل من 1.25 مل من 1% نشاء منحلة، 0.25 مل من محلول وقاء أسيتات 0.1 مول (pH 5)، 0.25 مل من الماء المقطر، 0.25 مل من المحلول الإنزيمي (المراد تحديد فاعليته).

يحضن المزيج في الدرجة 50° م مدة 10 دقائق في الحمام المائي، وتحدد كمية الغلوكوز المتحرر باستعمال حمض ثنائي نتروسالسيليك dinitrosalicylic acid (DNS) وفق طريق ميلر [Miller 1959]، حيث يضاف إلى مزيج التفاعل بعد مضي 10 دقائق من الحضن 3 مل من كاشف DNS مما يوقف التفاعل بين الإنزيم والمداد، بعد ذلك توضع الأنابيب في الحمام المائي في الدرجة 100° م مدة 15

دقيقة، ثم تبرد وتقاس الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 575 نانومتراً باستعمال المطيافية الضوئية Spectrophotometer، ويستعمل الغلوكوز كمرجع قياسي، حيث تحضر تركيزات مختلفة من محلول الغلوكوز لرسم منحني المعايرة، يتألف الناصع blank من 0.5 مل من محلول وقاء أسيتات 0.1 مول (pH 5)، 1.25 مل من 1% نشاء منحلة، و 0.25 مل ماء مقطر.

تعرف الوحدة الإنزيمية من ألفا–أميلاز بأنها كمية الإنزيم التي تحرر ميكرومولاً مكافئاً للغلوكوز واحداً في الدقيقة ضمن شروط التفاعل.

13. تحديد تركيز البروتين Total protein estimation

حُدد تركيز البروتين في المستخلص الإنزيمي بحسب طريقة لوري Lowry (1951) [Lowry et al.1951, Rajendra et al. 2007]، حيث يضاف إلى 1 مل من المحلول الإنزيمي 1 مل من حمض TCA تركيزه 50% و 1 مل ماء مقطر، ويترك مدة 24 ساعة في البراد 4° م ليترسب البروتين، ويؤخذ الراسب ويحل بإضافة 1 مل ماء مقطر، و1 مل من محلول NaOH 0.1 نظامي، ثم يضاف مع التحريك 5 مل من المزيج (المكون من: 100 مل محلول A + 1 مل محلول C + 1 مل محلول B)، وبعد 10 دقائق من إضافة المزيج يعاد التحريك مع إضافة 0.5 مل من المحلول D، وتقاس الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 660 انومتراً باستعمال المطيافية الضوئية، ويستعمل ألبومين مصل البقر bovine serum albumin كمرجع قياسي لرسم منحني المعايرة، ويتألف الناصع من 1 مل ماء مقطر و1 مل من محلول NaOH 0.1 نظامي و5 مل مزيج (C+B+A) و0.5 مل من المحلول D.

14. دراسة بعض خواص ألفا أميلاز المنتج بفعل العزلة *Bacillus* sp.68

1.14. تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الإنزيم Optimum pH

حددت من خلال تحضير الركيزة (1% نشاء) في محاليل وقائية (3، 4، 5، 6، 7، 8) وتحديد الفعالية في المستخلص الإنزيمي الخام، كما هو مبين في فقرة [Rajendra et al. 2007, Konsoula et al. 2005].

2.14. تحديد درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم Optimum temperature

درست من خلال حضن مزيج التفاعل (الموضح في فقرة تحديد الفاعلية) في درجات حرارة مختلفة (30، 40، 50، 60، 70، 80 ° م)، وحددت الفاعلية عند كل منها [Rajendra et al.2007, Konsoula et al. 2005].

15. التحليل الإحصائي Statistical analysis

أجري التحليل الإحصائي للنتائج باستعمال برنامج التحليل الإحصائي SPSSحيث حُسبت قيمة أقل فرق معنوي (LSD) بين العوامل المدروسة لمقارنة الفرق بين المتوسطات عند مستويي ثقة 5% و 1%، كما تم حساب قيم الانحراف المعياري.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

أولاً . نتائج عزل جراثيم الباسيلوس من التربة Isolation of *Bacillus* from soil

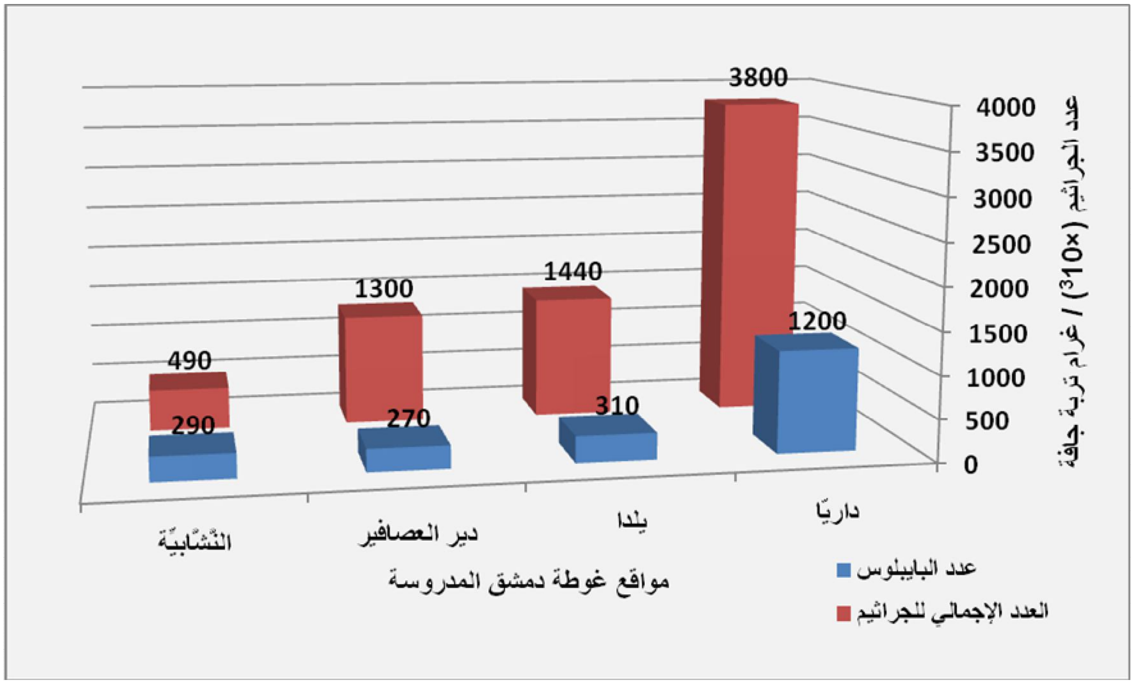
قُدِّر العدد الإجمالي للجراثيم، ونسبة الباسيلوس *Bacillus* في عينات التربة الممثلة للمواقع الأربعة في داريّا ويلدا ودير العصافير والنّشّابيّة، وكانت النتائج كما هو موضح في الجدول 3-1 حيث حُسب عددالجراثيم في الغرام الواحد من التربة الجافة بنسبة (عدد المستعمرات **CFUs** على الطبق × عامل التمديد) / الوزن الجاف للتربة (الشكل 3–1).

الجدول 3-1 عدد الجراثيم ($\times 10^3$) في الغرام الواحد من التربة المدروسة بغوطة دمشق في عام 2008

مصدر التربة	الرطوبة%	العدد الإجمالي*		% الباسيليوس من العدد العام
		للجراثيم	للباسيليوس *Bacillus*	
داريّا	20	3800 (± 9)	1200(±2)	31.6

يلدا	14	(3.51±) 1440	(7.23±) 310	21.5
دير العصافير	14	(3±) 1300	(5.75±) 270	21
شدّابيّة	7	(11.02±) 490	(15.72±) 290	59

*يمثل كل رقم ثلاثة مكررات، وما بين قوسين يمثل الانحراف المعياري.



الشكل 3–1 العدد الإجمالي للجراثيم وعدد جراثيم الباسيلوس في تربة غوطة دمشق في المواقع المدروسة في عام 2008

يلاحظ من بيانات الجدول 3-1 أن نسبة الرطوبة تراوحت بين 20% في داريا و7% في النشاءبية، وأن العدد الإجمالي للجراثيم تراوح بين 3800 × 10^3 خلية بكل غرام تربة في داريا و490 × 10^3 خ/غ تربة في النشاءبية، بينما تراوح عدد الباسيلوس بين 1200 × 10^3 خ/غ تربة في داريا و310 × 10^3 خ/غ تربة في يلدا، وهذا دليل على أهمية عامل الرطوبة في تنامي الجراثيم في التربة، إذ إنالرطوبة تؤثر تأثيراً شديداً في نشاط الأحياء الدقيقة إيجاباً أو سلباً، فالرطوبة عامل ضروري لأن الماء مكون أساسي في البروتوبلاسما، ولكنّ الرطوبة الزائدة تعوق التكاثر لأنها تؤدي إلى ضعف التبادل الغازي وانخفاض الأكسجين في الوسط، وبذلك يقل عدد الجراثيم الهوائية [Microbiology procedure soil 2009]وهذا يتفق مع ما استنتجه لستر وباولا وإرلاند [Lester et al. 1982, Paola & Erland 2008] إذإن عدد غالبية أنماط الجراثيم كان منخفضاً خلال الفترات التي كانت رطوبة التربة منخفضة فيها.

إن نتائج عدد الجراثيم المبينة في الجدول 3-1 تمثل جزءاً فقط من العدد الإجمالي للجراثيم الموجودة في التربة، ويرجع ذلك إلى أسباب عديدة منها أنه لا يمكن تحضير أوساط غذائية تتوافر فيها جميع الاحتياجات الغذائية لجميع أنواع جراثيم التربة، إضافة إلى أن الكثير من الأنواع لم تعرف بعد احتياجاته للنمو، وكذلك وجود الخلايا الجرثومية عادة ضمن جماعات في التربة، وعند تحضير تخفيفات لعيّنة التربة فمن غير المؤكد أن تؤدي عملية الرج إلى تشتيت هذه الجماعات مما يؤدي إلى انخفاض العدد المقدر عن العدد الفعلي للجراثيم في التربة [حمد 2005].

ويلاحظ أن نسبة عدد جراثيم الباسيلوس إلى العدد الإجمالي لجراثيم التربة تراوحت بين 59% في النشاعبية و 21% في دير العصافير، وهذا دليل على قدرة الأبواغ الداخلية لجراثيم الباسيلوس على الاستمرار والبقاء في الظروف القاسية، بينما تموت الخلايا الإعاشية للأنواع غير المتحملة للظروف القاسية.

يدلّ عدد جراثيم *Bacillus* على عدد أبواغ الجنس ذاته في عينة التربة، حيث أن المعاملة الحرارية تؤدي إلى قتل جميع الخلايا الإعاشية، وتنجو أبواغ الباسيلوس، إضافة إلى خلايا الجراثيم الأليفة الحر Thermophilic bacteria، ولكن أبواغ الباسيلوس تمتلك حساسية ومتطلبات حرارية مختلفة عنها لتنشط وتنتش وتنمو، وعلى هذا الأساس يمكن أن يحدد العدد الحقيقي للأبواغ الموجودة في عينة من التربة بدقة [Claus & Berkeley 1986].

فمثلاً، كان عدد الباسيلوس في عينات التربة المجموعة في فصل الخريف من تربة بنية على عمق 0 – 25سم مساوياً 60 – 70 × 10^3 خ/غ تربة [Katarzyna Grata 2008].

بعد تقدير العدد الإجمالي للجراثيم وعدد الباسيلوس ونسبتها اختُيرت المستعمرات النامية على أطباق الآغار المغذي التي استزرعت عليها العينات المعرّضة لصدمة حرارية (درجة حرارة 80°م مدة 10 دقائق) و عزلت هذه المستعمرات المتباينة من حيث الشكل واللون والحجم على أطباق جديدة، ثم أعيد استزراعها لتنقيتها بطريقة الزرع المتتالي على أطباق الآغار حتى الحصول على مستعمرات مفردة نقية للعزلات (الشكل 3-2).



B18 (هذا الشكل مميز للنوع *B. mycoides*)



B2



B19



B59

الشكل 3-2 بعض عزلات عصيات الباسيلوس المعزولة من تربة غوطة دمشق

وقد أمكن الحصول على **79** عزلة جرثومية نقية (رمِّزت من B1 إلى B79)، وتبين أنها تنتمي إلى الجنس *Bacillus* من خلال طريقة العزل ونتائج دراسة الصفات العامة المميزة لهذا الجنس الجرثومي، وقد توزعت هذه العزلات بحسب مواقع العزل كالآتي (الشكل 3-3):

* **26**عزلة من داريّا

رُقِّمت من B1 إلى B26

ونسبتها 33% من مجموع العزلات.

* **23** عزلة من النّشّابيّة

رُقّمت من B27 إلى B49

ونسبتها 29% من مجموع العزلات.

* **12** عزلة من دير العصافير

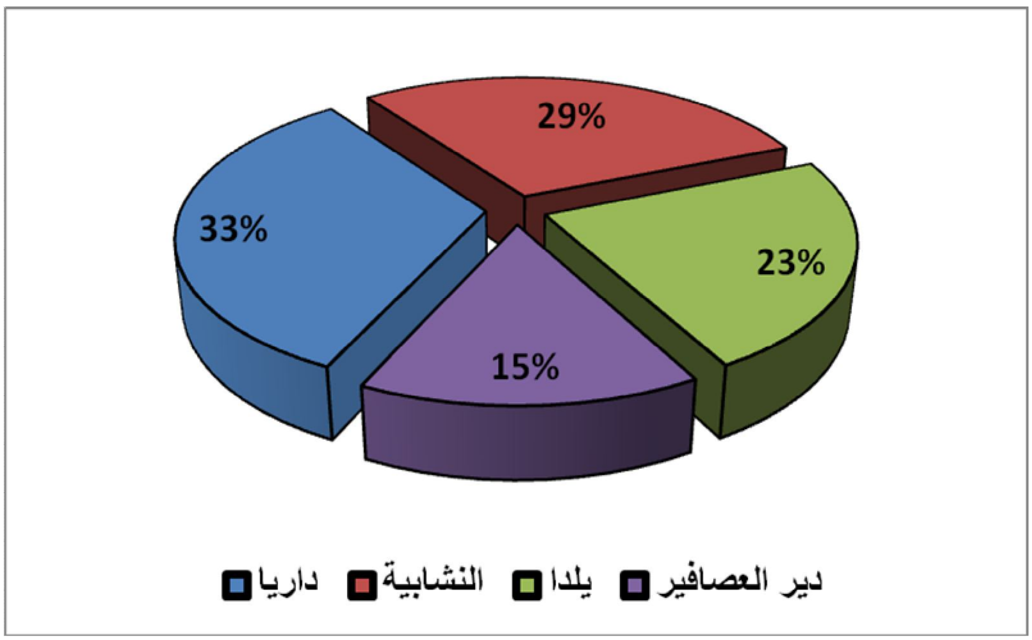
رُقّمت من B50 إلى B61

ونسبتها 15% من مجموع العزلات.

* **18** عزلة من يلدا

رُقّمت من B62 إلى B79

ونسبتها 23% من مجموع العزلات.



الشكل 3–3 توزع عزلات الباسيلوس المعزولة من تربة غوطة دمشق

ثانياً . دراسة الصفات العامة لعزلات الباسيلوس *Bacillus*

أُجريت دراسة أهم الصفات العامة التي تميّز الجنس *Bacillus* (الجداول 3–2، 3–3، 3–4، 3–5، 3–6، الشكلان 3–4، 3–5)، وهي:

(1) شكل المستعمرات ولونها.

(2) تلوينها بصبغة غرام.

(3) تفاعل الكاتلاز.

(4) الاحتياجات من الأكسجين الجوي.

(5) دراسة شكل الخلايا:

- عصوية طويلة
- عصوية قصيرة
- ميالة للشكل الكروي
- على شكل مضرب
- مستقيمة أو منحنية
- ذات نهايات مستديرة أو مربعة
- متفرعة أو غير متفرعة

(6) طريقة تجمّع الخلايا:

- مفردة
- مزدوجة
- في سلاسل طويلة أو قصيرة

(7) إنتاج الخلايا للأبواغ الداخلية Endospores، وتوضعها:

- مركزية
- تحت نهائية
- نهائية

[Claus & Berkeley 1986]

الجدول 3-2 الصفات الشكلية للباسيلوس المعزولة من تربة داريا في غوطة دمشق في عام 2008

Morphological characteristics of isolates

الرمز	تلوين بصبغة غرام	خصائص المستعمرات النامية على أطباق الآغار المغذي			
		اللون(1)	المظهر(2)	الارتفاع(3)	الحواف(4)
B1	+	بيج	كبيرة غير منتظمة	مسطحة	مموجة
B2	+	بيج	كبيرة مستديرة	مرتفعة	مفصصة
B3	+	كريم	صغيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B4	+	شفافة	كبيرة مستديرة	مسطحة	مفصصة

B5	+	بيج	كبيرة خيطية	مسطحة	متفرعة
B6	+	بيج	كبيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B7	+	بيج	كبيرة بيضوية	محدبة	شفافة ناعمة
B8	+	كريم	متحدة المركز	مسطحة	شفافة هدبية
B9	+	كريم	مستديرة مقسمة	مسطحة	ناعمة
B10	+	كريم	كبيرة متحدة المركز	مسطحة	شفافة ناعمة
B11	+	كريم	كبيرة مستديرة	مرتفعة	مفصصة
B12	+	كريم	كبيرة مستديرة	حافة مرتفعة	ناعمة
B13	+	كريم	كبيرة مستديرة	مرتفعة	ناعمة
B14	+	كريم	صغيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B15	+	كريم	كبيرة مغزلية	مسطحة	مفصصة
B16	+	كريم	كبيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B17	+	كريم	كبيرة مستديرة	مسطحة	شفافة مموجة
B18	+	كريم	جذرية	مسطحة	متفرعة
B19	+	كريم	كبيرة غير منتظمة	مرتفعة	مموجة
B20	+	كريم	كبيرة مستديرة	المركز مرتفع	متفرعة
B21	+	كريم	صغيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B22	+	شفافة	صغيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B23	-	بيج	مستديرة مع تعرج	محدبة	ناعمة
B24	+	كريم	مستديرة ذات مركز مرتفع	مرتفعة	متفرعة
B25	+	كريم	كبيرة غير منتظمة	مسطحة	شفافة هدبية
B26	+	كريم	كبيرة مستديرة	محدبة	ناعمة

توضيح:

(1) **اللون:** لون المستعمرة.

(2) **المظهر:** مستديرة، متحدة المركز، مستديرة مع حافة شعاعية، مستديرة مع حافة محارية، غير منتظمة الشكل، مستديرة مع حافة مرتفعة، خيطية، خيطانية، جذرية، متجعدة، معقدة.

(3) **الارتفاع:** محدبة، مرتفعة، مسطحة، جبلية، عقدية، على شكل نقطة سائل، على شكل فوهة بركان، تنمو داخل البيئة.

(4) **الحواف:** مفصصة، مموجة، ناعمة، متفرعة، هدبية، غير منتظمة، على شكل شعر، على شكل خيط، صوفية.

الجدول 3-3 الصفات الشكلية للباسيلوس المعزولة من تربة النشاءبية في غوطة دمشق في عام 2008

Morphological characteristics of isolates

الرمز	**تلوين غرام**	**خصائص المستعمرات النامية على أطباق الآغار المغذي**			
		اللون(1)	**المظهر** (2)	**الارتفاع**(3)	**الحواف**(4)
B27	+	كريم	كبيرة مستديرة	مرتفعة	ناعمة
B28	+	بيج	كبيرة مستديرة	مرتفعة	مموجة
B29	+	بيج	كبيرة مستديرة	مسطحة	شفافة مفصصة
B30	+	كريم فاتح	كبيرة غير منتظمة	مرتفعة	مموجة

B31	+	كريم فاتح	كبيرة غير منتظمة	مرتفعة	مموجة
B32	+	كريم فاتح	صغيرة مستديرة	مسطحة	ناعمة
B33	+	بيج	كبيرة مستديرة	مسطحة	ناعمة
B34	+	كريم	كبيرة بيضوية	مسطحة	مموجة
B35	+	كريم	كبيرة غير منتظمة	جبلية	شفافة هدبية
B36	+	كريم	صغيرة مستديرة	مسطحة	ناعمة
B37	+	كريم	كبيرة مستدير ة	مرتفعة	ناعمة شفافة
B38	+	كريم	صغيرة مستديرة	مسطحة	ناعمة
B39	+	كريم	كبيرة مستديرة	محدبة	مفصصة
B40	+	كريم	صغيرة مستديرة	مرتفعة	ناعمة
B41	+	بيج	كبيرة مستديرة	محدبة	شفافة ناعمة
B42	+	بيج	صغيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B43	+	كربم	كبيرة مستديرة	مسطحة	شفافة هدبية
B44	+	بيج	جذرية	مسطحة	متفرعة
B45	+	بيج	كبيرة مستديرة	مرتفعة	ناعمة
B46	+	بيج	كبيرة مستديرة	مسطحة	متفرعة
B47	+	بيج	صغيرة مستديرة	مسطحة	ناعمة
B48	+	بيج	كبيرة مستديرة	مرتفعة	هدبية
B49	+	بيج	كبيرة مستديرة	مرتفعة	هدبية

توضيح:

(1) **اللون:** لون المستعمرة.

(2) **المظهر:** مستديرة،متحدة المركز،مستديرة مع حافة متشععة، مستديرة مع حافة محارية، غير منتظمة الشكل، خيطانية، مستديرة مع حافة مرتفعة، خيطية، جذرية، متجعدة، معقدة.

(3) **الارتفاع:** محدبة، مرتفعة، مسطحة، جبلية، عقدية، على شكل نقطة سائل، على شكل فوهة بركان، تنمو داخل البيئة.

(4) **الحواف:** مفصصة، مموجة، ناعمة، متفرعة، هدبية، غير منتظمة، على شكل شعر، على شكل خيط، صوفية.

الجدول 3-4 الصفات الشكلية للباسيلوس المعزولة من تربة دير العصافير في غوطة دمشق في عام 2008

Morphological characteristics of isolates

الرمز	تلوين بصبغة غرام	خصائص المستعمرات النامية على أطباق الآغار المغذي			
		اللون(1)	المظهر(2)	الارتفاع(3)	الحواف(4)
B50	+	كريم	مستديرة مرتفعة المركز	مرتفعة	شفافة هدبية
B51	+	بيج	كبيرة مرتفعة المركز	مسطحة	ناعمة
B52	+	كريم	مستديرة متحدة المركز	محدبة	هدبية

B53	+	كريم	مستديرة مقسمة	مسطحة	مموجة
B54	+	كريم	كبيرة بيضوية	مرتفعة	مموجة
B55	-	كريم	كبيرة مستديرة	مسطحة	ناعمة
B56	+	كريم	كبيرة مستديرة	مرتفعة	شفافة هدبية
B57	+	بيج	كبيرة مستديرة	مسطحة	مرتفعة مموجة
B58		شفافة	كبيرة مستديرة	مسطحة	هدبية
B59	+	بيج	صغيرة مستديرة	مرتفعة	مفصصة
B60	+	كريم	كبيرة مستديرة	محدبة	مسطحة هدبية
B61	+	كريم	كبيرة متحدة المركز	فوهة بركان	هدبية

توضيح:

(1) **اللون:** لون المستعمرة.

(2) **المظهر:** مستديرة،متحدة المركز ،مستديرة مع حافة متشععة، مستديرة مع حافة محارية، غير منتظمة الشكل، خيطانية، مستديرة مع حافة مرتفعة، خيطية، جذرية، متجعدة، معقدة.

(3) **الارتفاع:** محدبة، مرتفعة، مسطحة، جبلية، عقدية، على شكل نقطة سائل، على شكل فوهة بركان، تنمو داخل البيئة.

(4) **الحواف:** مفصصة، مموجة، ناعمة، متفرعة، هدبية، غير منتظمة، على شكل شعر ، على شكل خيط، صوفية.

الجدول 3-5 الصفات الشكلية للباسيلوس المعزولة من تربة يلدا في غوطة دمشق في عام 2008

Morphological characteristics of isolates

الرمز	تلوين بصبغة غرام	خصائص المستعمرات النامية على أطباق الآغار المغذي			
		اللون(1)	المظهر(2)	الارتفاع(3)	الحواف(4)
B62	+	كريم فاتح	صغيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B63	-	بيج	كبيرة مستديرة	مرتفعة	مموجة

B64	+	بيج	كبيرة مستديرة	مرتفعة المركز	مسطحةمفصصة
B65	+	كريم	كبيرة متحدة المركز	محدبة	ناعمة
B66	+	كريم	صغيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B67	+	كريم	كبيرة متحدة المركز	فوهة بركان	ناعمة
B68	+	كريم	كبيرة بيضوية	مسطحة	مفصصة
B69	+	كريم	جذرية منتشرة	مسطحة	متفرعة
B70	+	كريم	كبيرة مستديرة	مرتفعة	هدبية
B71	+	كريم	صغيرة مستديرة	محدبة	ناعمة
B72	+	كريم	كبيرة مستديرة	مسطحة	هدبية
B73	+	كريم	كبيرة متحدة المركز	مرتفعة	مفصصة
B74	+	كريم	كبيرة مستديرة	جبلية	ناعمة
B75	+	بيج	كبيرة مستديرة	فوهة بركان	مرتفعة ناعمة
B76	+	كريم	كبيرة مستديرة	مرتفعة	غير منتظمة
B77	+	بيج	جذرية منتشرة	مسطحة	متفرعة
B78	+	كريم	كبيرة مستديرة	مسطحة	مموجة
B79	+	بيج	كبيرة مستديرة	مرتفعة	ناعمة

توضيح:

(1) **اللون:** لون المستعمرة.

(2) **المظهر:** مستديرة،متحدة المركز ،مستديرة مع حافة متشععة، مستديرة مع حافة محارية، غير منتظمة الشكل، خيطانية، مستديرة مع حافة مرتفعة، خيطية، جذرية، متجعدة، معقدة.

(3) **الارتفاع:** محدبة، مرتفعة، مسطحة، جبلية، عقدية، على شكل نقطة سائل، على شكل فوهة بركان، تنمو داخل البيئة.

(4) **الحواف:** مفصصة، مموجة، ناعمة، متفرعة، هدبية، غير منتظمة، على شكل شعر ، على شكل خيط، صوفية.

الجدول 3-6 نتائج اختبار الكاتلاز ومتطلبات الأكسجين

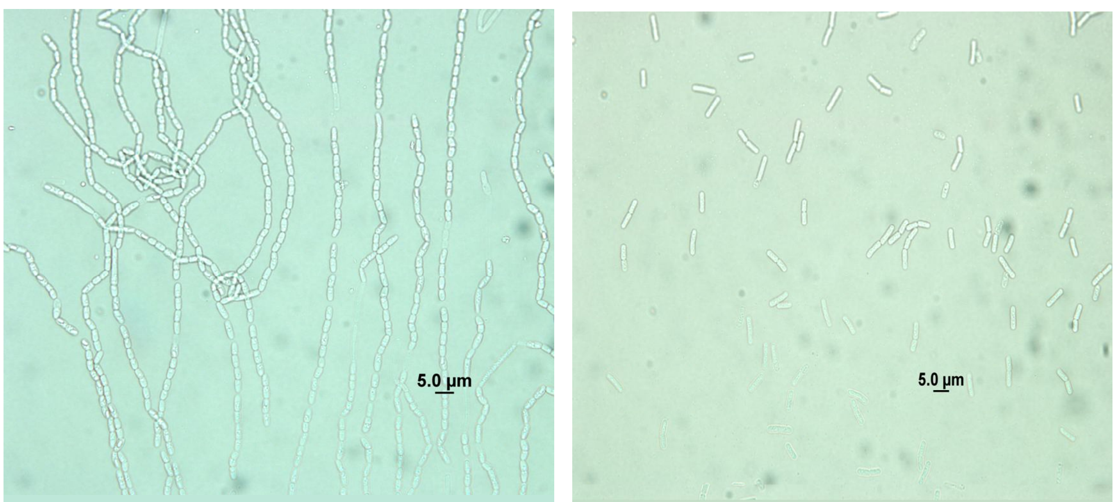
العزلة	الكاتلاز	متطلبات الأكسجين	العزلة	الكاتلاز	متطلبات الأكسجين
B1	+	Aerobic	**B2**	+	Facultative
B3	+	Aerobic	**B4**	+	Aerobic
B5	–	Aerobic	**B6**	+	Microaerophilic

Aerobic	+	**B8**	Aerobic	+	**B7**
Aerobic	+	**B10**	Aerobic	+	**B9**
Aerobic	+	**B12**	Aerobic	+	**B11**
Aerobic	+	**B14**	Aerobic	+	**B13**
Aerobic	+	**B16**	Microaerophilic	+	**B15**
Facultative	−	**B18**	Aerobic	+	**B17**
Aerobic	+	**B20**	Aerobic	+	**B19**
Facultative	+	**B22**	Microaerophilic	+	**B21**
Facultative anaerobic	+	**B24**	Facultative	+	**B23**
Aerobic	+	**B26**	Facultative anaerobic	+	**B25**
Aerobic	+	**B28**	Aerobic	+	**B27**
Facultative aerobic	+	**B30**	Aerobic	+	**B29**
Aerobic	+	**B32**	Microaerophilic	+	**B31**
Microaerophilic	−	**B34**	Aerobic	+	**B33**
Aerobic	+	**B36**	Aerobic	+	**B35**
Aerobic	+	**B38**	Aerobic	+	**B37**
Microaerophilic	+	**B40**	Microaerophilic	+	**B39**
Aerobic	+	**B42**	Aerobic	+	**B41**
Facultative	−	**B44**	Aerobic	+	**B43**
Microaerophilic	+	**B46**	Microaerophilic	+	**B45**
Aerobic	+	**B48**	Aerobic	−	**B47**
Aerobic	+	**B50**	Aerobic	+	**B49**
Microaerophilic	+	**B52**	Aerobic	−	**B51**

يتبع الجدول 3-6

متطلبات الأكسجين	الكاتالاز	العزلة	متطلبات الأكسجين	الكاتالاز	العزلة
Microaerophilic	+	**B54**	Aerobic	+	**B53**
Aerobic	+	**B56**	Aerobic	−	**B55**
Aerobic	+	**B58**	Aerobic	−	**B57**

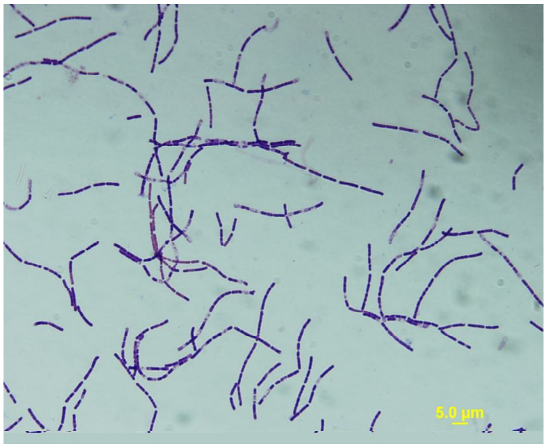
Aerobic	−	**B60**	Microaerophilic	+	**B59**
Microaerophilic	+	**B62**	Aerobic	−	**B61**
Microaerophilic	+	**B64**	Microaerophilic	+	**B63**
Aerobic	+	**B66**	Aerobic	−	**B65**
Microaerophilic	+	**B68**	Aerobic	+	**B67**
Facultative	+	**B70**	Microaerophilic	−	**B69**
Microaerophilic	+	**B72**	Facultative	+	**B71**
Microaerophilic	+	**B74**	Aerobic	+	**B73**
Microaerophilic	+	**B76**	Microaerophilic	+	**B75**
Facultative	+	**B78**	Microaerophilic	−	**B77**
			Aerobic	+	**B79**



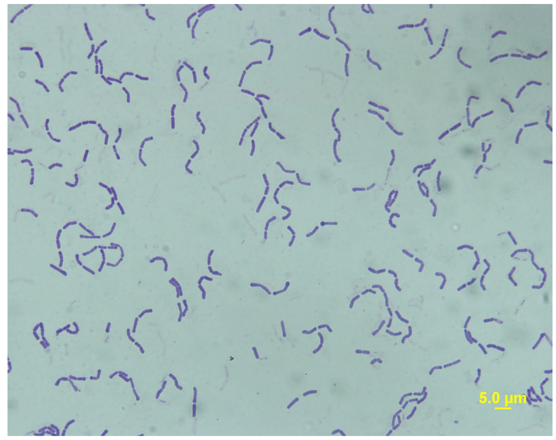
B6 **B2**

الشكل 3 – 4 الخلايا الحية للعزلتين B2 وB6

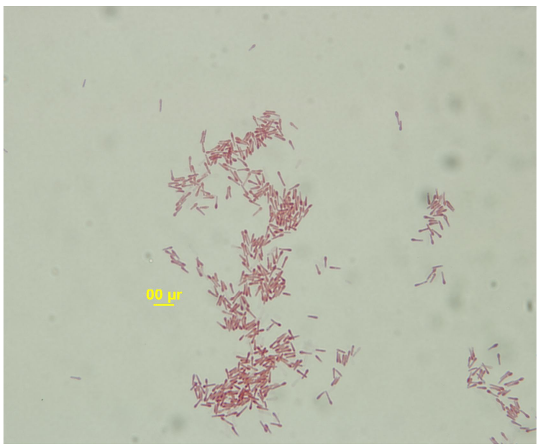
B1: الخلايا مفردة ومزدوجة ـ B6: الخلايا مرتبة بشكل سلاسل طويلة



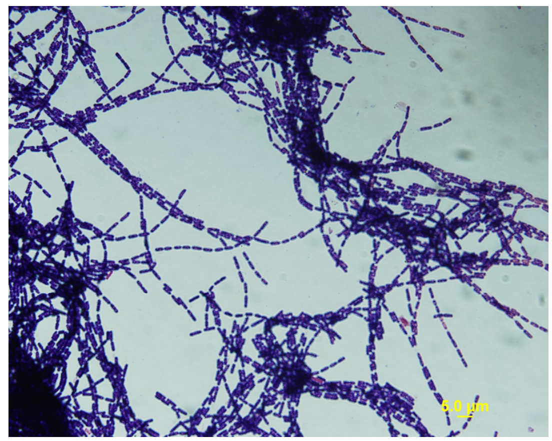
B33



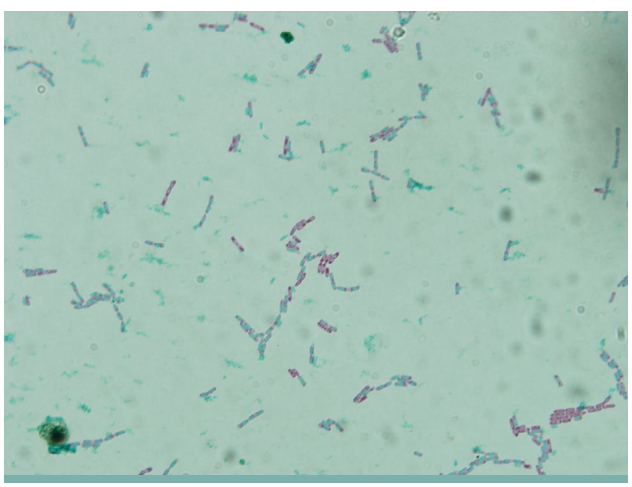
B8



B55



B44



B24

الشكل 3 – 5 تلون الخلايا بصبغة غرام (B8-B55-B33-B44)
وتلوين أخضر مالاكيت (B24 بوغة طرفية)

يلاحظ اعتماداً على بيانات الجداول السابقة أن معظم مستعمرات العزلات كانت كبيرة الحجم وبلون كريمي بدرجات مختلفة من القتامة والسطوع، وهذا ما يميز مستعمرات أنواع جنس الباسيلوس، مع أنه تبدي مستعمرات بعض أنواع الباسيلوس (ولاسيما النوع *B. subtilis*) تغيرات حادة في الشكل [Claus & Berkeley 1986].

وتبين كذلك أن جميع خلايا العزلات متحركة عصوية الشكل ومنتجة للأبواغ الداخلية وموجبة بصبغة غرام، عدا العزلات B63، B55، B23 التي كانت سالبة بصبغة غرام، واعتماداً على بيانات دليل **برجي** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology فإن خلايا أنواع الباسيلوس إيجابية بصبغة غرام، أو إيجابية فقط في المراحل المبكرة من النمو، أو سلبية بصبغة غرام.

ويُلاحظ أن جميع عزلات الجراثيم منتجة للكتلاز عدا العزلات B70، B69، B65، B61، B60، B57، B55، B51، B47، B44، B34، B18، B5، واعتماداً على بيانات دليل **برجي** فإن معظم سلالات الباسيلوس منتجة للكتلاز.

وتبين أن جميع العزلات هوائية أو أليفة قلة الأكسجين، أو لاهوائية اختيارياً، واعتماداً على بيانات دليل **برجي** فإن جميع أنواع الباسيلوس هوائية إجبارية Obligate aerobic أو لاهوائية اختيارية Facultative anaerobic.

وبالنتيجة، ومن خلال الخصائص المزرعية Culture characterization وبعض الاختبارات الحيوية الكيميائية المعيارية Standard biochemical tests عرفت هذه العزلات بأنها تنتمي إلى جنس الباسيلوس *Bacillus sp.*، وفي دراسات مشابهة استعملت هذه المعايير:

- ففي دراسة أجراها بيهال ورفاقه [Behal et al. 2006] عُني بتعريف وتصنيف العزلة المنتجة للأميلاز وكانت عصوية الشكل موجبة بصبغة غرام، وعرفّت بأنها *Bacillus sp.* وفقاً لدليل **برجي**.
- وكذلك في دراسة أجراها براباكارانا وبوغالفندهان [Prabakaran & R. Pugalvendhan. 2009] اعتُمدت هذه الخصائص لتعريف العزلات الجرثومية المعزولة من التربة والمنتجة للألفا أميلاز بأنها تنتمي إلى جنس الباسيلوس.

حُفظت عزلات جراثيم الباسيلوس التي أمكن الحصول عليها بطريقتين:

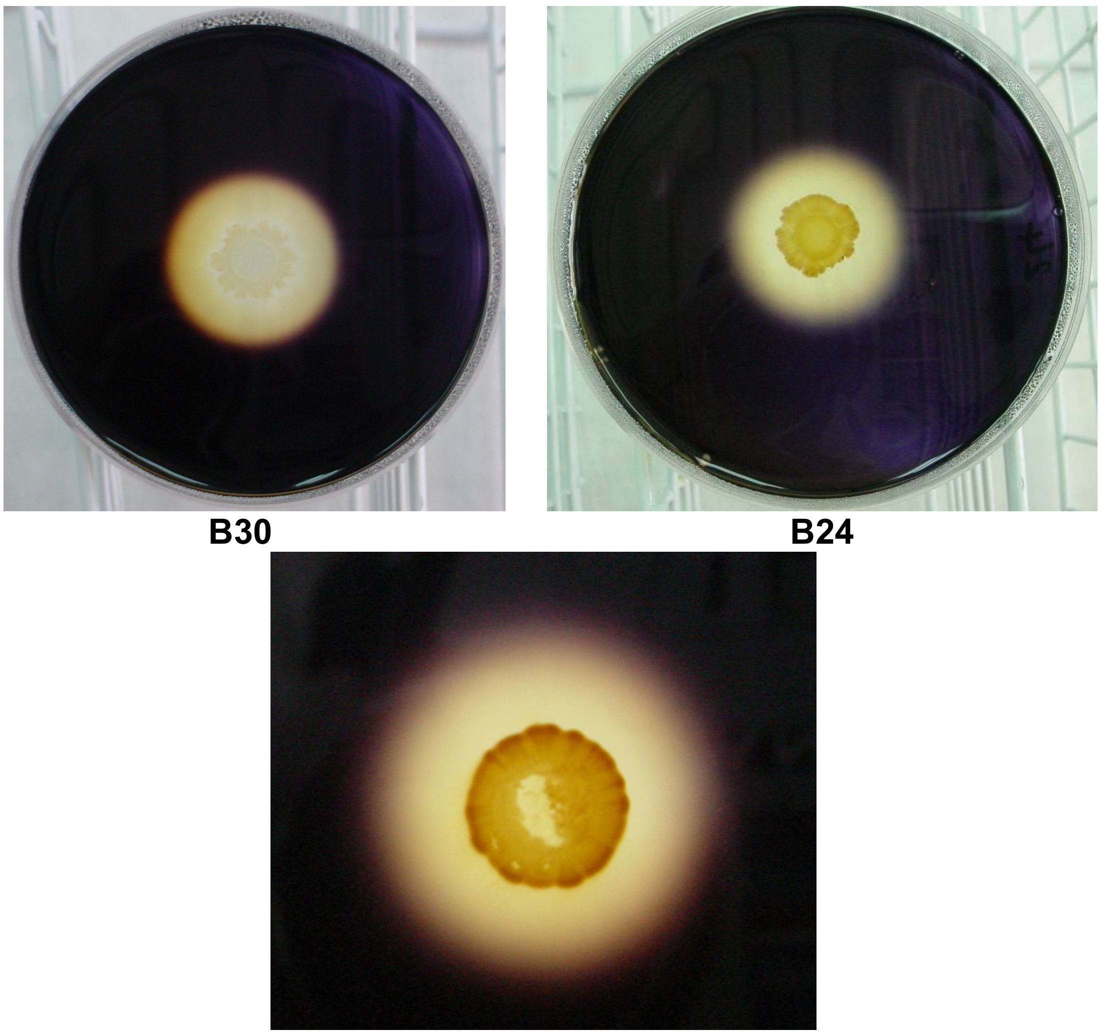
(1) على الآغار المغذي المائل في درجة حرارة 4 ْم.

(2) في الغليسيرول 15% في درجة حرارة -20 ْم.

ثالثاً. الغربلة الأولية لعزلات الباسيلوس

Primary Screening For *Bacillus* Isolates

خضعت عزلات الباسيلوس التي أمكن الحصول عليها من عينات التربة لعملية غربلة أولية باستعمال وسط آغار نشاء لاختبار قدرتها على حلمهة النشامن خلال إنتاجها للأميلاز، وقد ر ُوعي في تحضير أطباق الآغار أن تكون سماكتها متساوية، كما ر ُوعي في زرعها تساوي حجم اللقاح الجرثومي لغرض تماثل ظروف الزرع لجميع العزلات المختبر ة، وأظهرت النتائج أنه من بين 79 عزلة لجراثيم الباسيلوس كانت 62 عزلة منتجة للأميلاز و 17 عزلة غير منتجة له (الجدول 3-7)، وحددت كفاءة العزلات المنتجة استناداً إلى النسبة بين قطر الهالة الشفافة حول المستعمرة نتيجة تحلل النشاء بفعل الإنزيم وقطر نمو العزلة ذاتها (GZ/CZ) (الشكل 3-6).



B70

الشكل 3−6 الهالة المتكونة حول مستعمرات عزلات الباسيلوس المنتجة للأميلاز نتيجة تحليلها للنشاء

الجدول 3-7 نتائج غربلة العزلات المنتجة للأميلاز

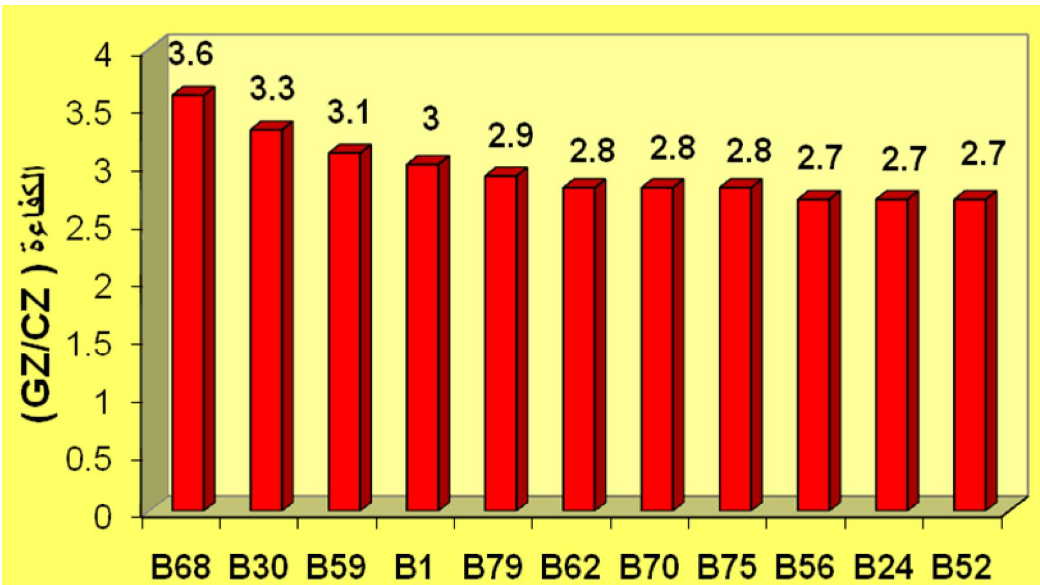
التسلسل	العزلة	نتيجة الاختبار	قطر الهالة، مم	قطر المستعمرة، مم	كفاءة العزلة
1	B68	+	36	10	3.6
2	B30	+	29.5	9	3.3
3	B59	+	34	11	3.1
4	B1	+	22.5	7.5	3.0
5	B79	+	28.5	10	2.9
6	B62	+	32	11.5	2.8
7	B70	+	23.5	8.5	2.8
8	B75	+	22	8	2.8
9	B56	+	31	11.5	2.7
10	B24	+	16	6	2.7
11	B52	+	24	9	2.7
12	B4	+	47	19	2.5
13	B29	+	21	9	2.3
14	B17	+	13.5	6	2.3
15	B76	+	28	12.5	2.2
16	B9	+	20	9	2.2
17	B72	+	15	7	2.1
18	B47	+	23	11	2.1
19	B25	+	28	13.5	2.1
20	B10	+	19	9.25	2.1
21	B67	+	14	7	2.0
22	B44	+	29	14.5	2.0
23	B74	+	21	11	1.9
24	B13	+	17	9	1.9
25	B64	+	17	9	1.9
26	B43	+	15	8	1.9
27	B15	+	29	15.5	1.9
28	B2	+	24	13	1.8
29	B57	+	12	6.5	1.8
30	B12	+	22	12	1.8
31	B14	+	20	11	1.8
32	B11	+	14.5	8	1.8
33	B6	+	18	10	1.8
34	B50	+	17	9.5	1.8
35	B41	+	14	8	1.8
36	B35	+	19	11	1.7
37	B8	+	12	7	1.7
38	B49	+	15	9	1.7
39	B48	+	18	11	1.7

يتبع الجدول 3−7

1.6	8.5	14	+	B33	40
1.6	4	6.5	+	B26	41
1.6	15	24	+	B20	42
1.6	12	19	+	B36	43
1.6	4.5	7	+	B28	44
1.5	20.5	31	+	B51	45
1.5	6	9	+	B37	46
1.5	9	13.5	+	B38	47
1.5	14	21	+	B73	48
1.4	23	32	+	B54	49
1.3	10.5	14	+	B7	50
1.3	13.5	17.5	+	B31	51
1.3	7	9	+	B60	52
1.3	7.5	9.5	+	B61	53
1.3	23	29	+	B19	54
1.2	9	11	+	B16	55
1.2	7.5	9	+	B65	56
1.1	8	9	+	B34	57
1.1	16	17.5	+	B46	58
1.1	44	46	+	B22	59
1.1	11	11.5	+	B27	60
1.02	49	50	+	B21	61
1.0	7	7	+	B23	62
0.0	9	0	-	B3	63
0.0	18	0	-	B5	64
0.0	متشعبة تملأ الطبق	0	-	B18	65
0.0	10	0	-	B32	66
0.0	10.5	0	-	B39	67
0.0	8	0	-	B40	68
0.0	8	0	-	B42	69
0.0	12	0	-	B45	70
0.0	10	0	-	B53	71
0.0	8	0	-	B55	72
0.0	6	0	-	B58	73
0.0	9	0	-	B63	74
0.0	7	0	-	B66	75
0.0	50	0	-	B69	76
0.0	17	0	-	B71	77
0.0	متشعبة تملأ الطبق	0	-	B77	78
0.0	5	0	-	B78	79

يتضح من الجدول 3-7 أن العزلات التي أظهرت قدرة على تحليل النشاء كانت متفاوتة في كفاءتها، حيث تراوحت كفاءتها بين 1.0 - 3.6، ويعود التفاوت في قطر الانحلال إلى تباين كمية الألفا ميلاز المنتج نتيجة الاختلاف الوراثي بين العزلات والعوامل المحفزة للتعبير المورثي، وقد رُتِّبت العزلات اعتماداً على قيم كفاءة الباسيلوس التي تعكس قدرة الجراثيم على إنتاج الأميلاز، واختيرت العزلات ذات الكفاءة العالية التي أعطت قيماً بين 2.7 - 3.6 لاستزراعها في الوسط السائل لإنتاج الإنزيم وتقييم إنتاجها كمياً (الشكل 3-7)، وهذه العزلات مرتبة وفقاً لازدياد كفاءتها:

B68 > B30 > B59 > B1 > B79 > B62 = B70 = B75 > B56 = B24 = B52



الشكل 3- 7 عزلات الباسيلوس ذات الكفاءة العالية في إنتاج الألفا أميلاز.

وفي دراسات مشابهة اعتُمد معيار الكفاءة (قطر الانحلال/ قطر النمو، أو قطر الانحلال فقط) لاختيار العزلات الأعلى إنتاجاً للألفا أميلاز، فمثلاً: اعتمد بيهال وزملاؤه [Behal et al. 2006]، وبراباكارانا وزميله [Prabakaran & Pugalvendhan 2009] طريقة قياس قطر منطقة الانحلال في غربلة عزلات الباسيلوس لاختبار إنتاجيتها للألفا أميلاز من خلال زرعها على وسط آغار مغذ يحتوي 1% نشاء منحل في مركز الطبق بشكل خطي، وحضنت ثم غمرت بمحلول لوغول لإظهار منطقة الانحلال، وقد حصل براباكارانا وبوغالفندهان في دراستهما على خمس عزلات للباسيلوس منتجة للأميلاز من عشر عينات تربة، تراوحت أقطار الانحلال فيها بين 0.9 – 1.4 مم. إن الحصول على سلالات محلية منتجة للأميلاز يعد الخطوة الأولى والأكثر أهميِّةً للحصول على مصدر إنزيمي للإنتاج تجارياً في حال عدم توافر سلالات قياسية معروفة بإنتاجها العالي، كما أنه قد تتفوق السلالات المعزولة محلياً على السلالات التجارية المستعملة في هذا المجال [عمران 2006].

رابعاً . الغربلة الكمية باستعمال الاستزراع السائل Liquid culture

اختُبرت العزلات الإحدى عشرة التي أعطت أعلى كفاءة على أطباق الآغار لتحديد العزلة الأفضل إنتاجاً للإنزيم باستعمال الوسط السائل الذي وصفه أشرف في عام 2004 [Ashraf 2004]، حيث تمت عملية التخمير Fermentation في دوارق حجمها 100 مل تحتوي 20مل من الوسط، ولُقِّح الوسط باللقاح الجرثومي ذي الكثافة الضوئية (Optical Density) 0.6 بنسبة 2% من حجم الوسط، وحضن مدة 48 ساعة في درجة حرارة 37ْم في حاضنة هزازة تدور بسرعة 200 دورة/د، وبعد انتهاء مدة الحضن،ثُفِّل وسط التخمير بسرعة 4 آلاف دورة/د مدة 15 دقيقة، ثم أخذ الطافي الذي يمثل المستخلص الإنزيمي الخام [Ikram-ul-Haq et al. 2005] لتحديد الفعالية الإنزيمية.

1. معايرة فعالية الألفا أميلاز α-amylase activity assay

جرى معايرة فعالية إنزيم الألفا الأميلاز المنتج في الوسط السائل وفقاً لطريقة أوكولو ورفاقه Okolo et al. (1995)، حيث تم إنشاء المنحنى المعياري، كما هو مبين في الجدول 3-8 والشكل 3-8، وقيست فعالية الألفا أميلاز في المستخلص الإنزيمي الخام من خلال تحويل قيم الكثافة الضوئية (عند طول موجة 575 نانومتر) الموافقة لتركيز الغلوكوز في العينات إلى وحدة إنزيمية/مل مقارنة بالمنحنى المعياري.

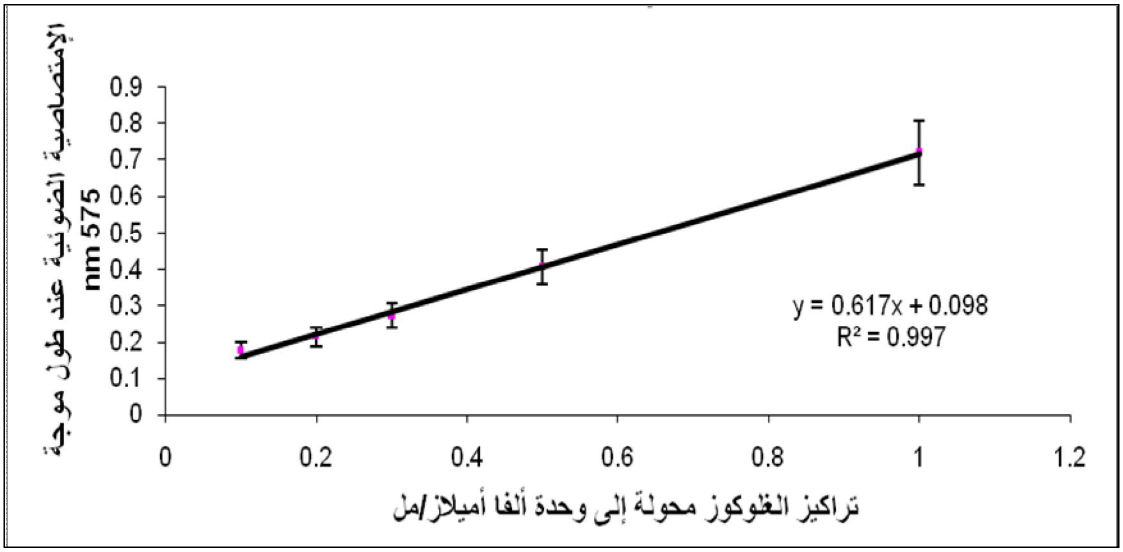
تعرف **الوحدة الإنزيمية** من ألفا أميلاز بأنها كمية الإنزيم التي تحرر ميكرومولاً واحداً من الغلوكوز في الدقيقة ضمن شروط التفاعل.

الجدول 3-8 عدد الوحدات الإنزيمية الموافقة لتركيز الغلوكوز

كمية الغلوكوز (mg)	الحجم (µl)	الامتصاصية عند طول موجة 575 (nm)	وحدة/مل IU/ml
0.45	250	(0.030±) 0.72	1
0.225	125	(0.015±) 0.406	0.5
0.135	75	(0.016±) 0.273	0.3
0.09	50	(0.009±) 0.214	0.2
0.045	25	(0.007±) 0.176	0.1

يمثل رقم الامتصاصية متوسطثلاثة مكررات

ويمثل الرقم بين قوسين الانحراف المعياري.



الشكل 3-8 منحنى معايرة الألفا أميلاز

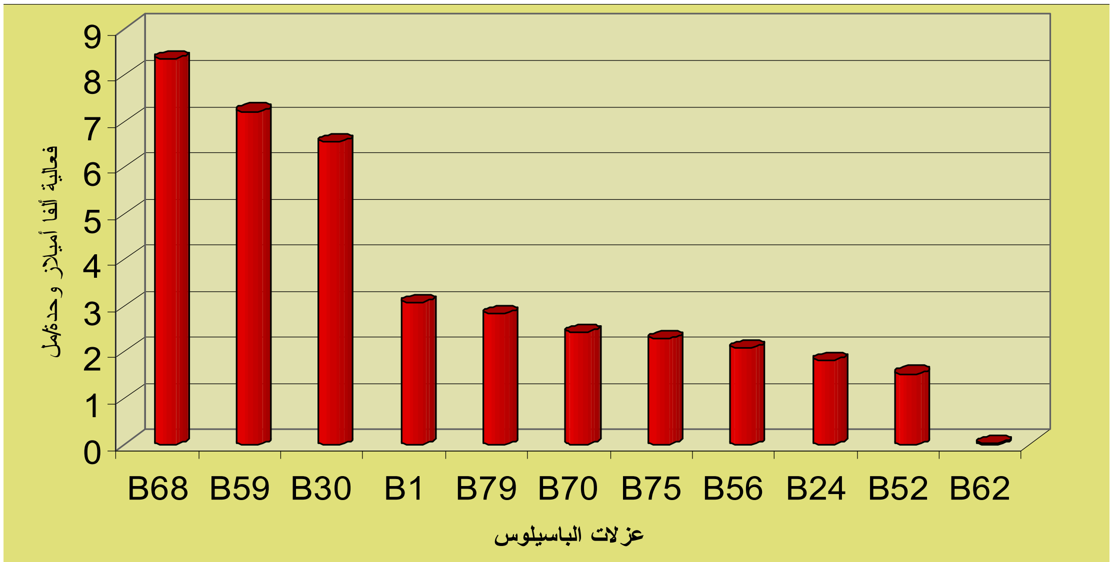
وقد أظهرت نتائج قياس فعالية الألفا أميلاز أن العزلة B68 كانت الأفضل إنتاجاً بين عزلات الباسيلوس المختبرة في شروط التخمير في الوسط السائل Liquid Fermentation، حيث أعطت هذه العزلة 8.35 وحدة/مل (الجدول 3–9، والشكل 3–9).

الجدول 3-9 فعالية الألفا أميلاز

رمز العزلة	الامتصاصية عند طول موجة 575 (nm)[1]	وحدة/مل IU/ml[2]
B1	0.193 (±0.035)	3.07
B24	0.154 (±0.001)	1.81
B30	0.301 (±0.019)	6.56
B52	0.145 (±0.019)	1.52
B56	0.163 (±0.003)	2.09
B59	0.321 (±0.007)	7.21
B62	0.099 (±0.001)	0.02
B68	0.356 (±0.011)	8.35
B70	0.173 (±0.011)	2.42
B75	0.169 (±0.012)	2.28
B79	0.186 (±0.006)	2.83

(1) يمثل قيم متوسط ثلاثة مكررات والرقم بين قوسين يمثل الانحراف المعياري.

(2) قيمة LSDعند مستوى ثقة 5% تساوي **1.635**، قيمة LSDعند مستوى ثقة 1% تساوي **2.222**



الشكل 3- 9 فعالية α–amylase المنتج من عزلات الباسيلوس المعزولة من تربة غوطة دمشق

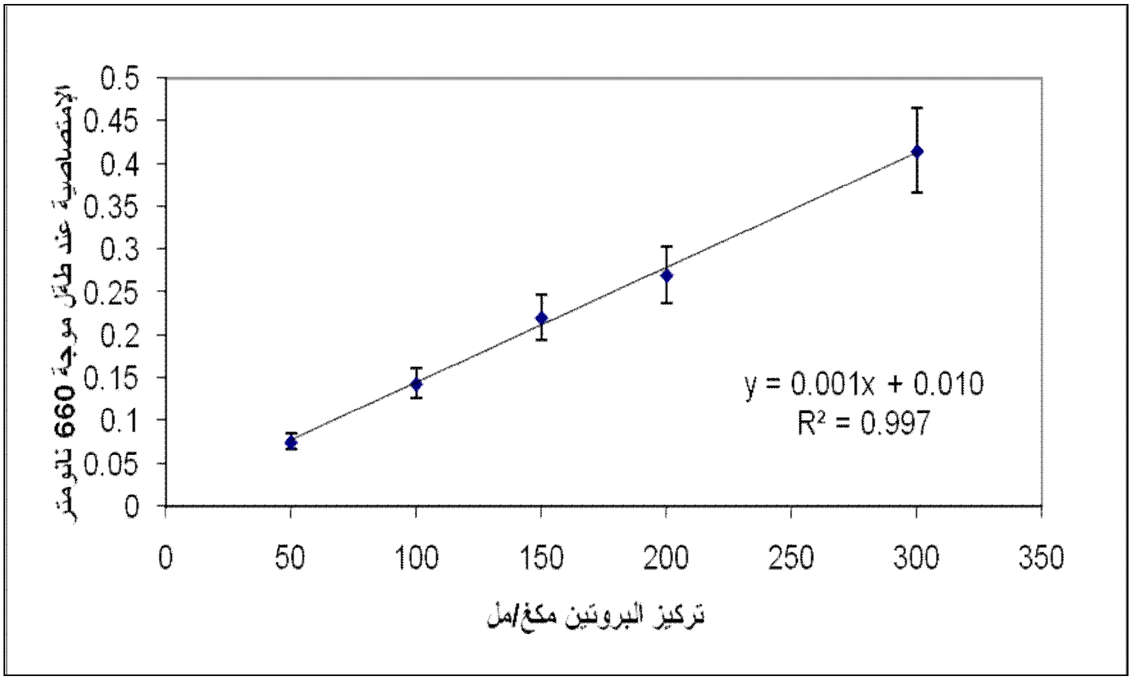
2.تقدير تركيز البروتين الكلي Total protein estimation

قدِّر تركيز البروتين الكلي وفقاً لطريقة لوري في عام 1951 [Lowry et al.1951]، حيث جرى إنشاء المنحنى المعياري باستعمال بروتين ألبومين مصل البقر bovine serum albumin كمرجع قياسي كما هو مبين في الجدول 3–10 والشكل 3–10، وتم تحديد تركيز البروتين في العينات (ملغ/مل) بتعويض قيم الكثافة الضوئية (عند طول موجة 660 نانومتر) للعينات في معادلة المنحنى المعياري للبروتين.

الجدول 3-10 قيم الامتصاصية الموافقة لتركيز البروتين

التركيز ميكروغرام/مل	الامتصاصية عند طول موجة 660 (nm)
50	(0.003±) 0.076
100	(0.011±) 0.144
150	(0.016±) 0.221
200	(0.004±) 0.270
300	(0.011±) 0.415

تمثل قيم الامتصاصية متوسط ثلاثة مكررات، والرقم بين قوسين يمثل الانحراف المعياري



الشكل 3–10 منحنى معايرة البروتين

والجدول 3–11 يوضح تركيز البروتين الكلي (ملغ/مل) في محلول ناتج التخمير باستعمال عزلات الباسيلوس.

الجدول 3-11 تركيز البروتين

العزلة	الامتصاصية عند طول موجة 660nm [1]	التركيز ملغ/مل [2]
B68	0.40 (±0.02)	0.30
B30	0.36 (±0.01)	0.27
B59	0.37 (±0.006)	0.27
B1	0.31 (±0.017)	0.23
B79	0.34 (±0.006)	0.25
B70	0.24 (±0.01)	0.18
B75	0.22 (±0.006)	0.16
B56	0.23 (±0.006)	0.17
B24	0.34 (±0.01)	0.25
B52	0.33 (±0.01)	0.25
B62	0.31 (±0.006)	0.23

[1] الرقم يمثل متوسط ثلاثة مكررات والرقم بين قوسين يمثل الانحراف المعياري

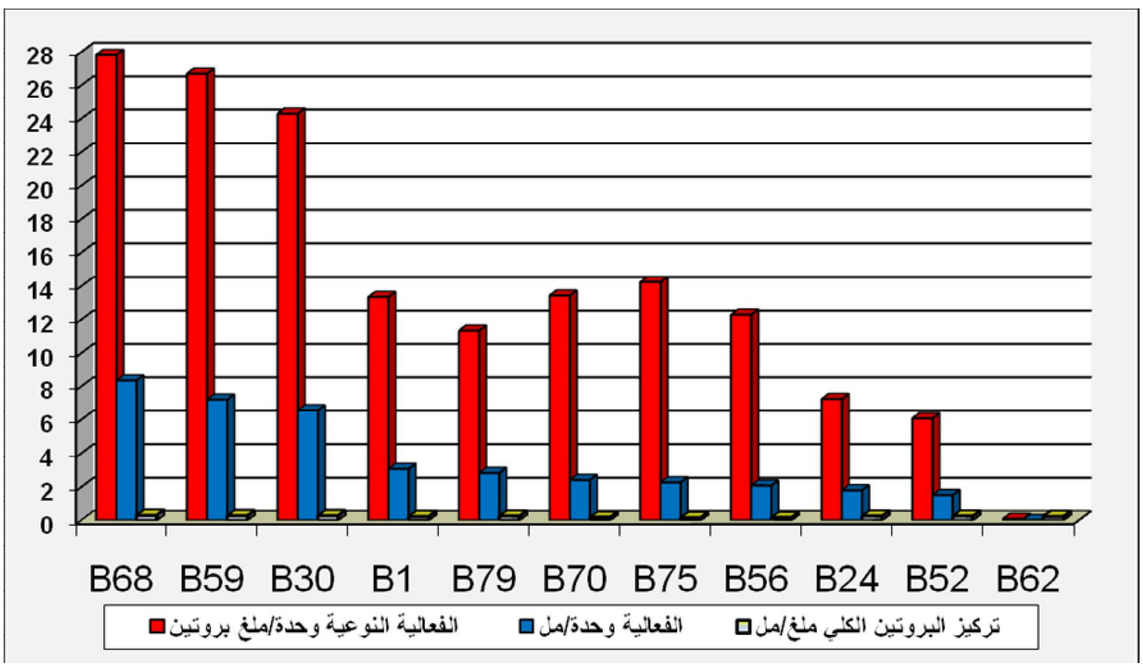
[2] قيمة LSD عند مستوى ثقة 1% تساوي **0.03**، قيمة LSD عند مستوى ثقة 5% تساوي **0.023**

3. الفعالية النوعية Specific activity

تم تحديد الفعالية النوعية للإنزيم بحساب النسبة بين الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل) وتركيز البروتين (ملغ/ مل)، حيث تزداد الفعالية النوعية بازدياد نسبة الإنزيم في البروتين الكلي المنتج، والجدول 3 – 12 والشكل 3 – 11 يوضحان الفعالية النوعية للألفا أميلاز المنتج من عزلات الباسيلوس المختارة.

الجدول 3-12 الفعالية النوعية للأميلاز

العزلة	وحدة/مل IU/ml	تركيز البروتين ملغ/مل	الفعالية النوعية وحدة/ملغ بروتين
B68	8.35	0.30	27.83
B59	7.21	0.27	26.70
B30	6.56	0.27	24.30
B1	3.07	0.23	13.35
B79	2.83	0.25	11.32
B70	2.42	0.18	13.44
B75	2.28	0.16	14.25
B56	2.09	0.17	12.29
B24	1.81	0.25	7.24
B52	1.52	0.25	6.08
B62	0.02	0.23	0.09



الشكل 3–11 مخطط الفعالية والفعالية النوعية

تبين النتائج التي أمكن الحصول عليها في هذه الدراسة أن العزلة B68 (الشكل 3–12) أعطت الإنتاج الأعلى من الألفا أميلاز مقارنة بالعزلات الأخرى، حيث بلغت فعاليتها الإنزيمية 8.5 وحدة/مل،

وفعاليتها النوعية 28 وحدة/ملغ بروتين، بينما تر اوحت فعالية الألفا أميلاز المنتج من بقية عزلات الباسيلوس بين 0.02- 7.21 وحدة/مل والفعالية النوعية بين 0.1-27 وحدة/ ملغ بروتين.

إن كمية الألفا-أميلاز التي أمكن الحصول عليها باستعمال عزلات الباسيلوس المدروسة ضمن شروط التخمير التي اتبعت في هذه الدراسة (**8.5** وحدة/مل باستعمال العزلة B68) يمكن تحسينها من خلال دراسة وتحديد الظروف الفضلى لإنتاج الإنزيم، حيث يؤثر عدد من العوامل المغذية والبيئية في الإنتاج، مثل: المصادر الكربونية والنتروجينية والأملاح المعدنية الداخلة في تركيب وسط التخمير [Dharani Aiyer, 2004]، والرقم الهيدروجيني للوسط، ومدة ودرجة حرارة الحضن، وحجم اللقاح الجرثومي. وكذلك يمكن تحسين الإنتاج باستعمال طرائق تخمير أخرى كطريقة المزرعة المغمورة Submerged Culture وطريقة المزرعة الصلبة Solid Culture، ويمكن كذلك تحسين الإنتاج عن طريق التحكم في ظروف الإنتاج في المخمر ودراسة نماذج الزراع في المخمر، كالمزرعة ذات الدفعة الواحدة (المغلقة) Batch Culture، والمزرعة ذات الدفعة الواحدة المغذاة (المغلقة مع التغذية) Fed-batch Culture، و المزرعة المستمرة Continuous Culture.

كما يمكن تحسين إنتاج الإنزيم من العزلة المنتخبة باستعمال طر ائق التطفير المختلفة وتقانات الهندسة الوراثية للحصول على صفات مرغوبة تجارياً [زهران وبريشة 2006].

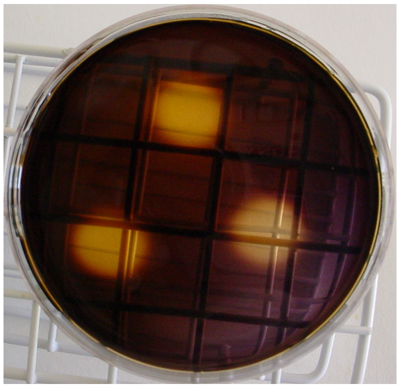
وذكرت الدراسات التي أجريت على إنتاج ألفا أميلاز بكميات متباينة باستعمال سلالات مختلفة من جراثيم الباسيلوس ضمن أوساط وشروط تخمير متباينة، ففي دراسة على إنتاج ألفا أميلاز من سلالة باسيلوس *Bacillus* sp.K-12 معزولة من تربة تركية كانت أعلى فعالية أمكن الحصول عليها 8.88 وحدة [Ozlem Kiran, et al. 2005]، وفي دراسة قام بها [Prabakaran & Pugalvendhan, 2009] بلغ أعلى إنتاج أمكن الحصول عليه باستعمال النوع *Bacillus subtilis* **74** وحدة/دقيقة وذلك بعد مدة حضن 48 ساعة في درجة الحرارة 37ْم، وفي دراسة لفيديالاكشمي وزملائه [Vidyalakshmi R., et al 2009] كان الإنتاج الأفضل **11** وحدة/مل بعد مدة حضن 10 ساعات في درجة حرارة 37ْم، كما أظهرت دراسة لإنتاج ألفا أميلاز من السلالة *Bacillus subtilis* AX20 أن الفعالية الأفضل كانت **38** وحدة/مل، وفي دراسة قام بها [Antony and Sahaya, 2009] أمكن الحصول على 14 عزلة باسيلوس من التربة منتجة للألفا-أميلاز تراوحت فعاليتها بين **15-28** وحدة/مل، وكذلك أمكن الحصول على طفرة فعاليتها 36 وحدة/مل، كما أمكن في دراسة أجراها [Bader J., et al. 2006] الحصول على **5.7** وحدة/مل باستعمال السلالة *Bacillus caldolyticus* DSM 405 في نظام المزرعة ذات الدفعة الواحدة في الدوارق وسجّلت إلينا وميري [Eliana and Meire, 2000] إمكان الحصول على **180** وحدة/مل باستعمال عزلة تعود للجنس *Bacillus* في وسط يحوي 1% مالتوز، و350 وحدة/مل في وسط يحوي 1%نشاءء منحل باستعمال نظام المزرعة ذات الدفعة الواحدة في الدوارق، وفي دراسة قام بها [Zheng

et al. 2000] أمكن الحصول على **409** وحدة/مل باستعمال النوع *Bacillus subtilis* في شروط التخمير في الدوارق، وفي دراسة للعوامل المؤثرة في إنتاج ألفا أميلاز باستعمال أنواع باسيلوس معزولة من مخلفات غذائية كان الإنتاج الأفضل (27 وحدة/مل) عند درجة حرارة 37°م ورقم هيدروجيني 7 باستعمال القمح كمصدر كربوني طبيعي [Sekar et al. 2007].

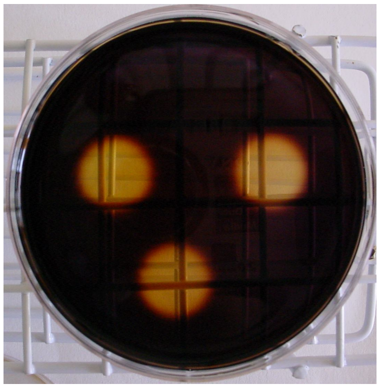
وللتأكد من فعالية المستخلص الإنزيمي للعزلة B68 أجريت مقارنة بين المستخلص ومحلول إنزيمي قياسي 5 وحدة/مل محضر من بودرة إنزيم منتج من الفطر *Aspergillus oryzae* محضرة من شركة Serva، حيث أعطت كمية 20ميكرولتراً من المستخلص الإنزيمي للعزلة B68 هالة قطرها 20 مم على وسط آغار نشاء، بينما أعطى المحلول الإنزيمي القياسي هالة قطرها 18.5 مم بعد حضن مدة 20 ساعة في حرارة 40°م (الشكل 3–13).



الشكل 3–12 العزلة B68



المستخلص الإنزيمي للعزلة B68

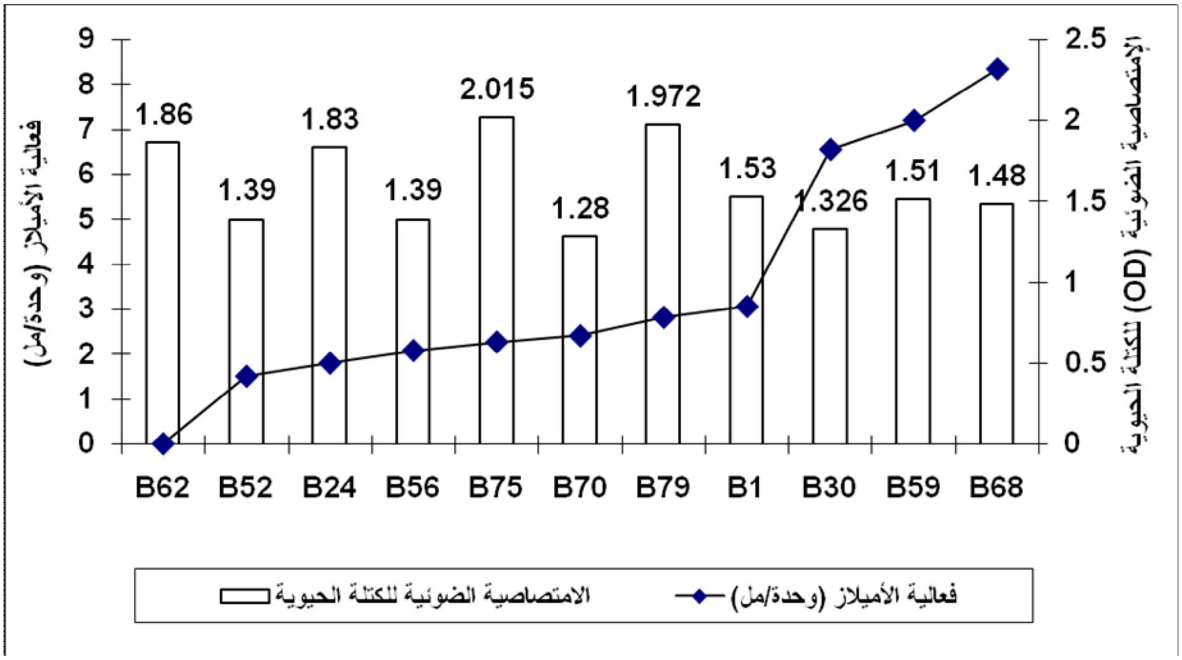


المحلول الإنزيمي القياسي

الشكل 3–13 الهالات الناتجة عن تحلل النشاء باستعمال المستخلص الإنزيمي للعزلة B68 والمحلول الإنزيمي القياسي

4. تقدير الكتلة الحيوية Biomass estimation

قُدِّرت الكتلة الحيوية في وسط التخمير في نهاية الحضن مباشرة بقياس الكثافة الضوئية عند طول موجة 600 نانومتر باستعمال المطيافية الضوئية Spectrophotometer (الشكل 3–14).



الشكل 3–14 مقارنة إنتاج الألفا أميلاز مع الكتلة الحيوية المنتجة

وأوضحت النتائج أنه لا يوجد ارتباط ثابت بين إنتاجنزيم الأميلاز وا ٍنتاج الكتلة الحيوية للسلالات المختبرة، فقد تراوحت الامتصاصية الضوئية للكتلة الحيوية للعزلات بين 1.28 و2.015، وكانت قيمة الامتصاصية الضوئية للعزلة B68 التي أظهرت أعلى فعالية مساويةً 1.48، بينما كانت قيمة الامتصاصية للعزلة B62 التي أظهرت أدنى فعالية مساويةً 1.86، و هذه النتائج متفقة مع نتائج عدد من الدراسات السابقة، حيث تؤكد هذه الدراسات أنه لا يوجد ارتباط كمي بين إنتاج الإنزيمات بفعل الأحياء الدقيقة وكتلتها الحيوية Biomass [Hamilton et al. 1995]، فقد وجد ثيبسوامي وزملاؤه 2006 عدم وجود علاقة بين إنتاج الكتلة الحيويةوا ٍنتاج الأميلاز من الباسيلوس *Bacillus* sp. [Thippeswamy S. et al. 2006].

خامساً. الاختبارات التشخيصية للعزلات ذات الكفاءة العالية في إنتاج الألفا أميلاز

أجري بعض الاختبارات لتحديد الخصائص الفيزيولوجية و الحيوية الكيميائية Physiological and biochemical properties لتشخيص العزلات الإحدى عشرة التي أعطت أعلى كفاءة وتحديد أنواعها، و هذه الاختبارات هي الآتية (الشكل 3−15 و 3−16):

(1) النمو في ظروف لاهوائية.

(2) اختبار فوجس بروسكور.

(3) الكشف عن القدرة على تخمير بعض السكاكر وإنتاج الحمض والغاز في وسط مرق تخمر الكربوهيدرات.

(4) إماهة الهلام.

(5) اختبار تمثيل السترات.

(6) إرجاع النترات.

(7) إنتاج الإندول.

(8) النمو في pH6.8 و pH5.8 على وسط Sabouraud dextrose Agar.

(9) النمو في تركيزات ملحية مختلفة من NaCl.

(10) النمو في درجات حرارة مختلفة.

(11) إنتاج الأكسيداز Oxidase.

(12) اختبار تفكيك اليوريا.

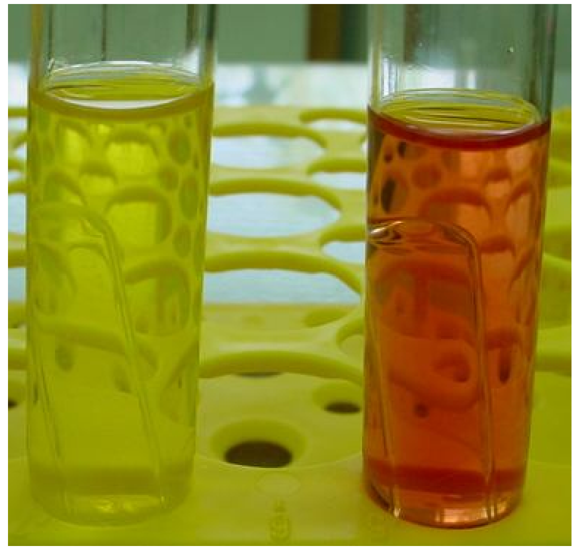
(13) اختبار أحمر الميثيل.

(14) حلمهة البروتين.

(15) إرجاع الليتموس Litmus.

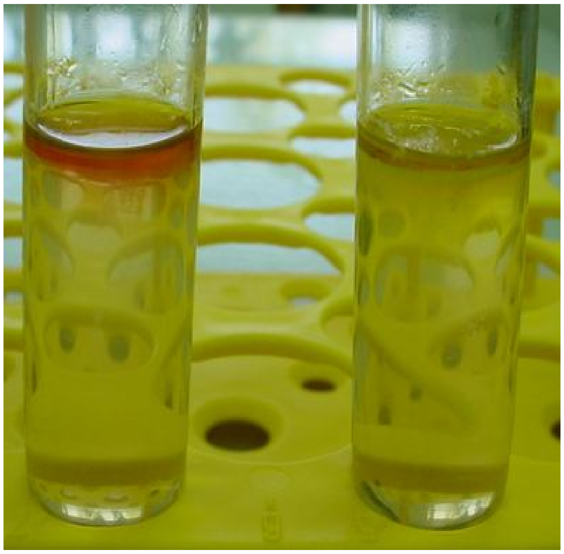
(16) اختبار تخمر الغلوكوز واللاكتوز والسكروز وإنتاج الغاز وإنتاج كبريت الهيدروجين H2S على وسط الحديد الثلاثي السكر (TSI) Triple Sugar Iron Agar.

وكانت النتائج كما هو مبين في الجدول 3−13.



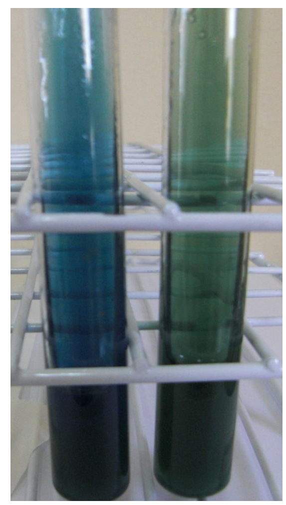
سلبي إيجابي

إختبار تخمر الكربوهيدرات



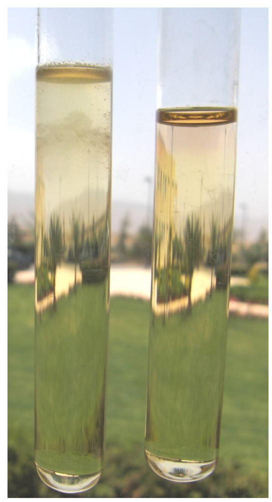
سلبي إيجابي

اختبار إنتاج الإندول

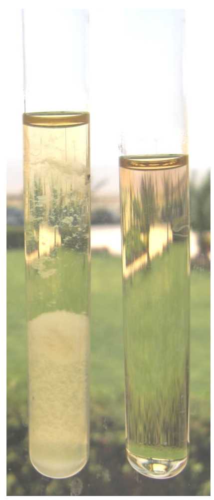


سلبي إيجابي

اختبار السترات

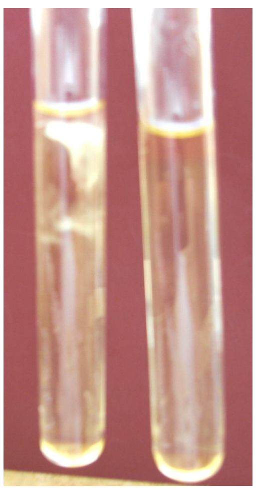


شاهد نمو أعلى الأنبوب
(نمو هوائي)



شاهد نمو أسفل الأنبوب
(نمو لاهوائي)

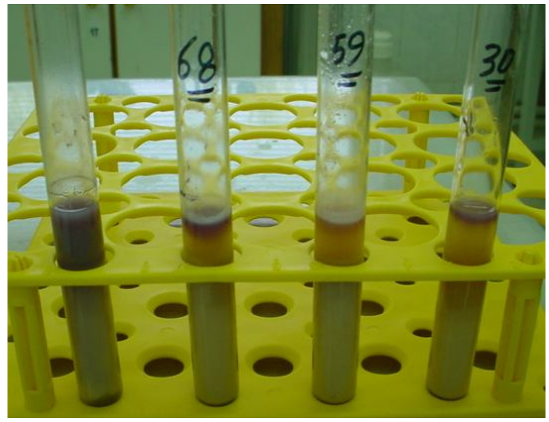
اختبار النمو الهوائي واللاهوائي
على وسط تيوغليكولات



إيجابي
(تشكل ضبابة حول منطقة الوخز)

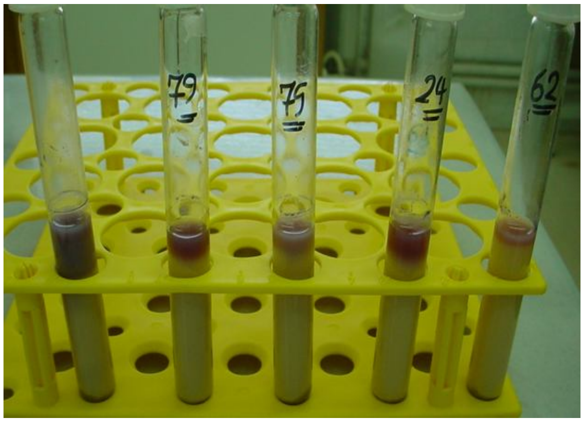
اختبار الحركة

الشكل 3–15 بعض الاختبارات الحيوية.



شاهد

حلمهة البروتين



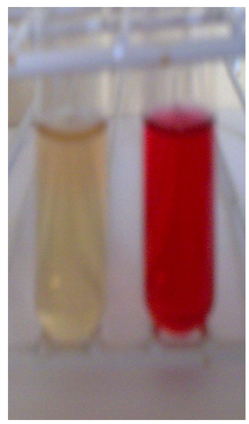
شاهد

إرجاع الليتموسLitmus



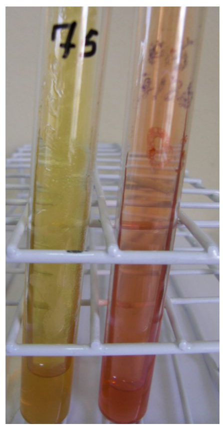
إيجابي سلبي

اختبار VP

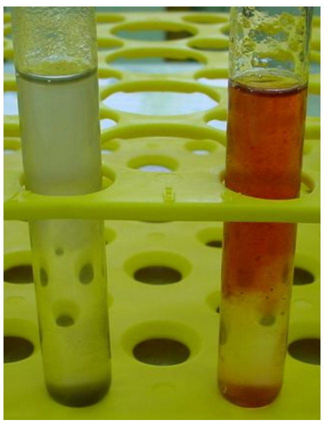


إيجابي سلبي

اختبار MR



اختبار TSI



اختبار إرجاع النترات

الشكل 3-16 صور لبعض الاختبارات الحيوية.

الجدول 3–13 الاختبارات التشخيصية للعزلات

Characteristics	1. *B1*	2. *B24*	3. *B30*	4. *B52*	5. *B56*	6. *B59*	7. *B62*	8. *B68*	9. *B70*	10. *B75*	11. *B79*
Cell diameter>1.0μm	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Spores round	–	–	–			–		–	–	–	–
Sporangium swollen	–	–	–		–	–	–	–	+	–	–
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
Voges-Proskauer test	+	+	+	–	–	+	+	+	+	–	+
Acid from D-Glucose	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+
Acid from L-Arabinose	+	+	–	–	–	+	+	–	–	–	+
Acid from D-Xylose	+	+	+	–	–	+	+	–	–	–	+
Acid from D-Mannitol	+	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+
Acid from D-Galactose	–	+	–	–	–	+	+	+	–	+	+
Acid from D-Fructose	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+
Acid from D-Sorbitol	+	+	+	–	–	+	+	+	–	–	+
Acid from Lactose	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Acid from Cellobiose	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
Acid from D-Sucrose	+	–	+	–	–	+	+	+	–	+	+
Acid from Maltose	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hydrolysis of Gelatin	+	–	+	–	–	+	–	+	+	+	+
Hydrolysis of Starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of Citrate	+	+	+	–	–	+	+	+	–	–	–
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Formation of Indole	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Growth at pH 6.8 nutrient Broth	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+
Growth at pH 5.7 nutrient Broth	+	+	+	–	+	+	–	+	–	–	+
Growth in NaCl 2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in NaCl 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in NaCl 7%	+	–	+	+	–	+	–	+	–	+	+
Growth in NaCl 10%	+	–	+	–	–	+	–	+	–	+	+
Growth at 10°C	+	–	+	+	+	–	+	–	+	+	+
Growth at 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 50°C	+	+	+	–	+	+	–	+	–	–	+
Growth at 55°C	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
Growth at 65°C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Methyl red test	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+
Proteolysis	–	–	+	–	–	+	–	+	–	–	–
Litmus reduction	–	+	–	+	+	–	+	–	–	+	+
تخمر اللاكتوز أو السكروزأو كلاهما في وسط TSI	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+
إنتاج كبريت الهيدروجينH2S و توليد الغاز في وسط TSI	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

وبمقارنة نتائج الاختبارات بدليل برجي Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [Claus & Berkeley, 1986] أمكن تحديد النوع لبعض هذه العزلات حيث عرِّفت العزلات B79-B30-B1 بأنها *Bacillus subtilis*، والعزلة B24 *Bacillus cogulans*، والعزلتان B68-B59 بأنهما *Bacillus licheniformis*، والعزلة B75 بأنها *Bacillus firmus*، بينما لم تحدد أنواع العزلات B70-B62-B56-B52، كما هو موضح في الجدول 3–14.

الجدول 3–14 تحديد النوع للعزلات وفق دليل برجي 1986

رمز العزلة	النوع	نسبة التطابق
B1	*Bacillus subtilis* 1	%99
B24	*Bacillus coagulans*	%95
B30	*Bacillus subtilis* 2	%95
B52	*Bacillus* sp. 52	
B56	*Bacillus* sp. 56	
B59	*Bacillus licheniformis* 1	%98
B62	*Bacillus* sp. 62	
B68	*Bacillus licheniformis* 2	%95
B70	*Bacillus* sp. 70	
B75	*Bacillus firmus*	%99
B79	*Bacillus subtilis* 3	%90

واستعملت الاختبارات الحيوية الكيميائية لتشخيص عزلات الباسيلوس في كثير من الدراسات، فقد قام محسن ورفاقه Mohsen et al. (2005) بتشخيص السلالة *B.subtilis* AX20 باستعمال الاختبارات الحيوية الكيميائية إضافة إلى تتالي 16S rRNA [Mohsen et al.2005].

كما قام منصور ورفاقه Mansour T. et al. (2008) بتعريف العزلات الجرثومية بالاعتماد على اختبارات صبغة غرام وإنتاج الأبواغ الداخلية وتخمير السكاكر وإنتاج الكتلاز وإماهة الجيلاتين واختبار السترات واختبار تفكيك اليوريا واختبار ليتموس Litmus milk واختبار TSI بحسب Claus and Berkeley,1986 إضافة إلى اختبارات أخرى أجريت باستعمال كيت اختبار MicrogenTM Bacillus-ID منتج من شركة (MID-66, Microgen Bioproducts Ltd., UK) [Mansour T. et al. 2008].

سادساً . دراسة بعض خواص الإنزيم المنتج بفعل العزلة B68 (*Bacillus licheniformis* 2)

1. تأثير الرقم الهيدروجيني pH في فعالية الألفا أميلاز

Effect of pH on α-amylase activity

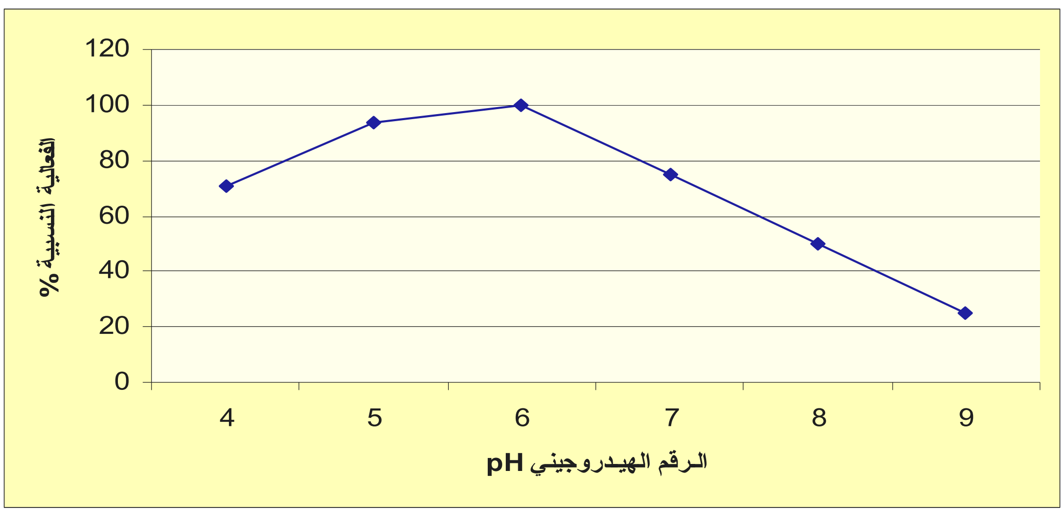
تتأثر فعالية الإنزيم بتغير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل، وتعرف درجة pH الفضلى بأنها الدرجة التي يكون عندها الإنزيم بفعاليته العظمى، وقد درست فعالية الألفا أميلاز المنتج بفعل العزلة B68 في أوساط تفاعل يتراوح رقمها الهيدروجيني بين 4 – 9، وبينت النتائج أن الفعالية الفضلى للإنزيم كانت عند pH 6 وتناقصت الفعالية بانخفاض وارتفاع الرقم الهيدروجيني عن نقطة pH 6، حيث كانت الفعالية النسبية 71% عند الرقم pH 4 و25% عند الرقم pH 9 مقارنة بالفعالية 100% عند الرقم pH 6 (الجدول 3–15، والشكل 3–17).

الجدول 3–15 تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الألفا أميلاز

الرقم الهيدروجيني	الامتصاصية عند طول موجة 575 (nm) (1)	وحدة/مل (2)
4	0.76 (±0.108)	8.80
5	1.02 (±0.004)	11.66
6	1.09 (±0.065)	12.42
7	0.804 (±0.071)	9.29
8	0.525 (±0.0.49)	6.20
9	0.244 (±0.049)	3.09

(1) الرقم يمثل متوسط ثلاثة مكررات والرقم بين قوسين يمثل الانحراف المعياري

(2) قيمة LSD عند مستوى ثقة **1%** تساوي **3.47**، قيمة LSD عند مستوى ثقة **5%** تساوي **2.47**.



الشكل 3–17 تأثير الرقم الهيدروجيني pH في فعالية ألفا أميلاز α-amylase

2. تأثير درجة الحرارة في فعالية الألفا أميلاز

Effect of temperature on α-amylase activity

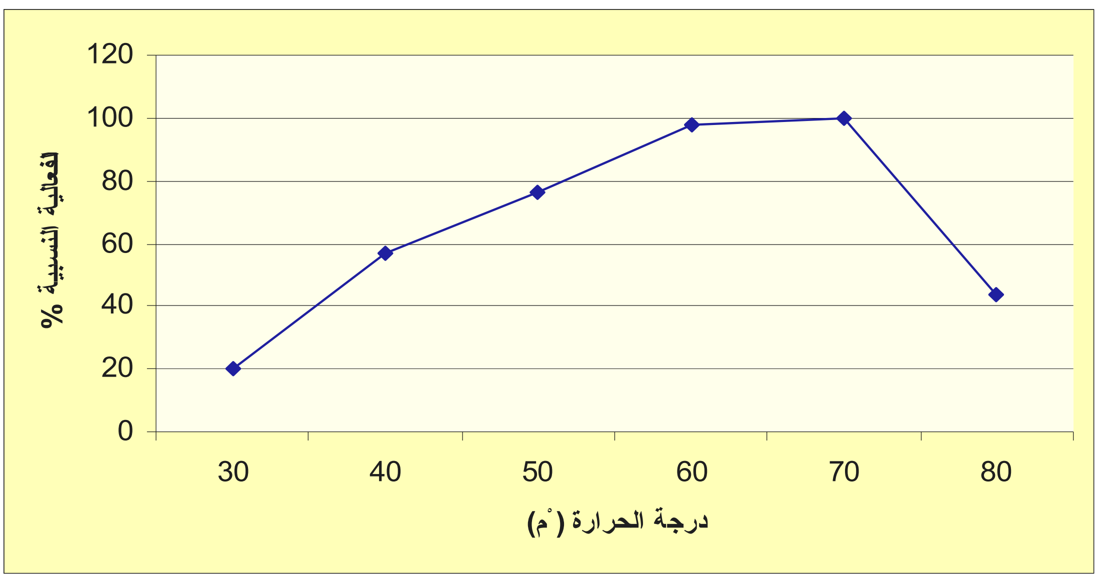
درست فعالية الألفا أميلاز الذي أمكن الحصول عليه في هذه الدراسة من العزلة B68 (*Bacillus licheniformis* 2) في وسط تفاعل رقمه الهيدروجيني 6 في درجات حرارة مختلفة تراوحت بين 30-80 ْم، وتبين أن الفعالية الفضلى للإنزيم كانت في حرارة 70 ْم وتقل هذه الفعالية بانخفاض الحرارة عن 70 ْم وارتفاعها عنها، حيث كانت الفعالية النسبية 20% في الدرجة 30 ْم وكانت الفعالية النسبية 44% في الدرجة 80 ْم مقارنة بالفعالية 100% في الدرجة 70 ْم (الجدول 3-16، والشكل 3-18).

الجدول 3-16 تأثير درجة الحرارة في فعالية الألفا أميلاز

درجة الحرارة (ْم)	الامتصاصية عند طول موجة 575 (nm) [1]	وحدة/مل [2]
30	0.173 (±0.065)	2.30
40	0.55 (±0.07)	6.47
50	0.75 (±0.049)	8.66
60	0.963 (±0.032)	11.06
70	0.99 (±0.021)	11.33
80	0.415 (±0.012)	4.99

[1] الرقم يمثل متوسط ثلاثة مكررات والرقم بين قوسين يمثل الانحراف المعياري

[2] قيمة LSD عند مستوى ثقة **1%** تساوي **2.12**، قيمة LSD عند مستوى ثقة **5%** تساوي **1.52**



الشكل 3-18 تأثير درجة الحرارة على فعالية ألفا أميلاز α-amylase

وقد سجلت الدراسات إنتاج عدد من إنزيمات الألفا أميلاز المختلفة في خواصها من حيث درجة الرقم الهيدروجيني الأفضل لعمل الألفا أميلاز ودرجة الحرارة الفضلى لعمله [زهران وبريشة 2006]، ففي

دراسة لإنزيم ألفا أميلاز منتج بوساطة السلالة *Bacillus subtilis* AX20 كان الرقم الهيدروجيني الأفضل pH=6 ودرجة الحرارة الفضلى 55ْم [Mohsen F.N., et al. 2005]، وفي دراسة أخرى باستعمال سلالة أليفة الحر thermophilic *Bacillus* sp strain SMIA-2 كان الرقم الهيدروجيني الأفضل pH=7.5 ودرجة الحرارة الفضلى 70ْم [Carlos, et al. 2002].

إن إنزيم الألفا أميلاز الذي أمكن الحصول عليه في هذه الدراسة باستعمال العزلة B68 (*Bacillus licheniformis* 2) أظهر أعلى فعالية عند درجة حرارة 70ْم ورقم هيدروجيني pH=6، وبالتالي من الممكن استعماله في التطبيقات الصناعية التي تتطلب المعاملة بدرجات حرارة عالية نسبياً ورقم هيدروجيني معتدل.

الملحقات Appendix

الاختبارات التوصيفية لبعض أنواع الجنس ***Bacillus*** **[يحسب Claus & Berkeley 1986].**

Characteristics	1.*B. subtilis*	2. *B. acidocaldarius*	3. *B. alcalopfilus*	4. *B. alvei*	5. *B. anthracis*	6. *B. azotoformans*	7. *B. badius*	8. *B. brevis*	9. *B. cereus*	10. *B. circulans*	11. *B. coagulans*	12. *B. fastidiosus*
Cell diameter>1.0μm	–	ND	–	–	+	–	V	–	+	–	–	+
Spores round	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Sporangium swollen	–	+	+	+	–	+	–	+	–	+	V	–
Catalase	+	ND	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	–	–	–	+	+	–	–	–	+	d	+	–
Voges-Proskauer test	+	–	–	+	+	–	–	–	+	–	+	NG
Acid from D-Glucose	+	ND	+	+	+	–	–	d	+	+	+	NG
Acid from L-Arabinose	+	ND	+	–	–	ND	–	–	–	+	d	NG
Acid from D-Xylose	+	ND	+	–	–	–	–	–	–	+	d	NG
Acid from D-Mannitol	+	ND	+	–	–	–	–	d	–	+	d	NG
Acid from D-Galactose						–				+		
Acid from D-Fructose						–				+		
Acid from D-Sorbitol			+						–	d		
Acid from Lactose			+			–			–	+		
Acid from Cellobiose										+		
Acid from D-Sucrose			+						+	+		
Acid from Maltose			+			–			+	+		
Gas from glucose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hydrolysis of Gelatin	+	ND	+	+	+	–	ND	d	+	d	–	–
Hydrolysis of Starch	+	+	+	+	+	–	–	d	+	+	+	–
Utilization of Citrate	+	–	–	–	d	+	–	d	+	d	d	–
Nitrate reduced to nitrite	+	ND	–	–	+	ND	–	d	+	d	d	–
Formation of Indole	–	–	–	+	ND	–	–	–	–	–	–	ND
Growth at pH 6.8 nutrient Broth	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Growth at pH 5.7 nutrient Broth	+	d	–	–	+	–	–	d	+	d	+	–
Growth in NaCl 2%	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
Growth in NaCl 5%	+	ND	–	d	+	–	+	–	ND	d	–	+
Growth in NaCl 7%	+	ND	–	–	+	–	ND	–	d	d	–	–
Growth in NaCl 10%	ND	ND	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–
Growth at 10°C	d	–	ND	–	–	ND	–	–	d	d	–	+
Growth at 30°C	+	–	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+
Growth at 40°C	+	–	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+
Growth at 50°C	d	+	–	–	–	–	+	d	–	–	+	–
Growth at 55°C	–	+	–	–	–	–	–	d	–	–	+	–
Growth at 65°C	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Oxidase	d			+		+	–		–	–		+
Urea	–		–	–		–		–	d	d	–	

Characteristics	13. *B. firmus*	14. *B. globisporus*	15. *B. insolitus*	16. *B. larvae*	17. *B. laterosporus*	18. *B. lentimorbus*	19. *B. lentus*	20. *B. licheniformis*	21. *B. macerans*	22. *B. macquariensis*	23. *B. marinus*	24. *B. megaterium*
Cell diameter>1.0μm	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	V	+
Spores round	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	V
Sporangium swollen	–	+	–	+	+	+	–	–	+	+	–	–
Catalase	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+	–	–
Voges-Proskauer test	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Acid from D-Glucose	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from L-Arabinose	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	d
Acid from D-Xylose	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	d	d
Acid from D-Mannitol	+	–	–	d	+	–	+	+	+	+	–	d
Acid from D-Galactose										+	–	
Acid from D-Fructose											+	
Acid from D-Sorbitol	–						d				–	
Acid from Lactose		+	–							+	+	
Acid from Cellobiose											–	
Acid from D-Sucrose	+	+	–				+			+	+	
Acid from Maltose										+	+	
Gas from glucose	–	–	–	–	–	–	–	(–)	+	–	–	–
Hydrolysis of Gelatin	+	+	–	+	d	–	d	+	+	–	+	+
Hydrolysis of Starch	+	d	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Utilization of Citrate	–	–	–	–	–	–	–	+	d	–	–	+
Nitrate reduced to nitrite	d	d	–	d	+	–	d	+	+	–	d	d
Formation of Indole	–	–	–	–	d	–	–	–	–	–	–	–
Growth at pH 6.8 nutrient Broth	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Growth at pH 5.7 nutrient Broth	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	ND	d
Growth in NaCl 2%	+	+	d	+	ND	–	ND	+	ND	+	+	ND
Growth in NaCl 5%	+	–	–	–	d	–	ND	+	–	–	ND	ND
Growth in NaCl 7%	+	–	–	–	–	–	d	+	–	–	d	d
Growth in NaCl 10%	ND	–	–	–	–	–	ND	ND	–	–	–	ND
Growth at 10°C	d	+	+	–	–	–	ND	–	d	+	+	+
Growth at 30°C	+	d	–	+	+	+	+	+	+	–	d	+
Growth at 40°C	+	–	–	+	d	–	ND	+	+	–	–	d
Growth at 50°C	–	–	–	–	–	–	–	+	d	–	–	–
Growth at 55°C	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Growth at 65°C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Oxidase		+	+		d			d			v	d
Urea	–	+	–		–	–	d	–	–	–	–	d

Characteristics	25. *B. mycoides*	26. *B. pantothenticus*	27. *B. pasteurii*	28. *B. polymyxa*	29. *B. popilliae*	30. *B. pumilus*	31. *B. schlegelii*	32. *B. sphaericus*	33. *B. stearothermophilus*	34. *B. thuringiensis*
Cell diameter>1.0μm	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Spores round	−	V	+	−	−	−	+	+	−	−
Sporangium swollen	−	+	+	+	+	−	+	+	+	−
Catalase	+	+	+	ND	−	+	+	+	d	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+
Voges-Proskauer test	+	−	−	+	−	+	−	−	−	d
Acid from D-Glucose	+	+	ND	+	+	+	−	−	+	+
Acid from L-Arabinose	−	−	ND	+	−	+	−	−	d	−
Acid from D-Xylose	−	−	ND	+	−	+	−	−	d	−
Acid from D-Mannitol	−	−	ND	+	−	+	−	−	d	−
Acid from D-Galactose										
Acid from D-Fructose										
Acid from D-Sorbitol										
Acid from Lactose								−		
Acid from Cellobiose										
Acid from D-Sucrose										
Acid from Maltose										
Gas from glucose	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
Hydrolysis of Gelatin	+	+	+	+	−	+	−	d	+	+
Hydrolysis of Starch	+	+	−	+	−	−	−	−	+	+
Utilization of Citrate	d	−	ND	−	−	+	−	d	d	+
Nitrate reduced to nitrite	+	d	+	+	−	−	+	−	d	+
Formation of Indole	−	−	ND	−	−	−	−	−	−	−
Growth at pH 6.8 nutrient Broth	−	−	ND	−	−	−	−	−	−	−
Growth at pH 5.7 nutrient Broth	+	−	−	+	−	+	−	d	−	+
Growth in NaCl 2%	ND	+	+	ND	+	+	+	ND	ND	+
Growth in NaCl 5%	ND	+	+	−	−	+	−	d	d	+
Growth in NaCl 7%	d	+	+	−	−	+	−	d	−	+
Growth in NaCl 10%	ND	+	+	−	−	ND	−	−	−	ND
Growth at 10°C	d	−	ND	+	−	+	−	+	−	d
Growth at 30°C	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+
Growth at 40°C	d	+	d	+	−	+	−	d	+	+
Growth at 50°C	−	d	−	−	−	d	+	−	+	−
Growth at 55°C	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−
Growth at 65°C	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−
Oxidase	−			j		d	+	+	d	d
Urea	d	−	+	−		−	−	d	−	d

<u>الرموز</u> (رموز جدول الاختبارات التوصيفية لبعض أنواع الجنس *Bacillus*)

– : 90% أو أكثر من السلالات سالبة.

+ : 90% أو أكثر من السلالات موجبة.

V : السلالة غير مستقرة.

d : 11-89% من السلالات إيجابية.

ND: لا توجد بيانات.

NG: لا يوجد نمو.

(–) : كمية قليلة من الغاز يمكن أن تشكل.

تحضير الوقاء Buffer preparation [Murray 1990]

(1) وقاء فوسفات سترات Citrate-phosphate buffer

المحاليل الأساسية:

محلول A: محلول حمض الليمون Citric acid 0.1 مول (19.21غ في 1000مل).

محلول B: محلول فوسفات صوديوم ثنائية Na2HPO4.7H2O 0.2 مول (53.65 غ في 1000مل).

يحضر الوقاء حسب الرقم الهيدروجيني pH المطلوب بإضافة حجم X من المحلول A إلى حجم Y من المحلول B وا إتمام الحجم بالماء المقطر إلى 100مل كالآتي:

X	Y	pH	X	Y	pH
24.3	25.7	**5**	42.2	7.8	**2.8**
23.3	26.7	**5.2**	39.8	10.2	**3**
22.2	27.8	**5.4**	37.7	12.3	**3.2**
21.0	29.0	**5.6**	35.9	14.1	**3.4**
19.7	30.3	**5.8**	33.9	16.1	**3.6**
17.9	32.1	**6**	32.3	17.7	**3.8**
16.9	33.1	**6.2**	30.7	19.3	**4**
15.4	34.6	**6.4**	29.4	20.6	**4.2**
13.6	36.4	**6.6**	27.8	22.2	**4.4**
9.1	40.9	**6.8**	26.7	23.3	**4.6**
6.5	43.6	**7**	25.2	24.8	**4.8**

(2) وقاء فوسفات Phosphate buffer

المحاليل الأساسية:

محلول A: محلول فوسفات صوديوم أحادية Monobasic sodium phosfate 0.2 مول (27.8غ في 1000مل).

محلول B: محلول فوسفات صوديوم ثنائية Dibasic sodium phosphate 0.2 مول (53.65غ من Na2HPO4.7H2O في 1000مل).

يحضر الوقاء حسب الرقم الهيدروجيني pH المطلوب بإضافة حجم X من المحلول A إلى حجم Y من المحلول B وا إتمام الحجم بالماء المقطر إلى 200 مل كالآتي:

X	Y	pH	X	Y	pH
45.0	55.0	**6.9**	93.5	6.5	**5.7**
39.0	61.0	**7.0**	92.0	8.0	**5.8**
33.0	67.0	**7.1**	90.0	10.9	**5.9**
28.0	72.0	**7.2**	87.7	12.3	**6.0**
23.0	77.0	**7.3**	85.0	15.0	**6.1**
19.0	81.0	**7.4**	81.5	18.5	**6.2**
16.0	84.0	**7.5**	77.5	22.5	**6.3**
13.0	87.0	**7.6**	73.5	26.5	**6.4**
10.5	90.5	**7.7**	68.5	31.5	**6.5**
8.5	91.5	**7.8**	62.5	37.5	**6.6**
7.0	93.0	**7.9**	56.5	43.5	**6.7**
5.3	94.7	**8.0**	51.0	49.0	**6.8**

(3) وقاء غليسين- ماءات الصوديوم Glycine-NaOH buffer

المحاليل الأساسية:

محلول A: محلول غليسين 0.2 مول (15.01 غ في 1000 مل).

محلول B: محلول NaOH 0.2 مول.

يضاف 50 مل من المحلول A إلى X مل من المحلول B ، ويتمم الحجم بالماء المقطر إلى 200 مل كالآتي:

X	pH	X	pH
22.4	**9.6**	4.0	**8.6**
27.2	**9.8**	6.0	**8.8**
32.0	**10.0**	8.8	**9.0**
38.6	**10.4**	12.0	**9.2**
45.5	**10.6**	16.8	**9.4**

الاستنتاجات Conclusions

1. ينتشر جنس الباسيلوس بنسبة عالية في تربة غوطة دمشق، حيث تراوحت نسبته بين 59% في نللّشّبّيا ّ ة و 21% في دير العصافير من العدد الإجمالي لجراثيم التربة.
2. يمكن عزل أنواع كثيرة من جنس الباسيلوس من البيئة المحلية في سورية، فقد أمكن عزل 79 عزلة في هذه الدراسة من مواقع مختلفة من غوطة دمشق،و أظهرت هذه العزلات خصائص شكلية وحيوية كيميائية مختلفة.
3. توجد نسبة مرتفعة (79%) من عزلات جنس الباسيلوس قادرة على إنتاج الألفاأميلاز.
4. تفاوتت كفاءة عزلات جنس الباسيلوس في إنتاج الألفا أميلاز على أطباق الآغار.
5. يمكن ترتيب العزلات الإحدى عشرة التي أظهرت كفاءة أعلى، وفقاً لكفاءتها:

B68 > B30 > B59 > B1 > B79 > B62 = B70 = B75 > B56 = B24 = B52

6. أظهرت الزراعة السائلة في الدوارق بطريقة الدفعة الواحدة للعزلات الأعلى كفاءة على أطباق الآغار مستويات مختلفة من إنتاج الألفا أميلاز.
7. كانت العزلة B68 التي صنِّفت على أنها *Bacillus licheniformis* 2 الأعلى فعالية، حيث أعطت فعالية نوعية مقدارها 28 وحدة/ملغ بروتين.
8. يبدي إنزيم الألفا أميلاز الذي تنتجه العزلة *Bacillus licheniformis* 2 فعالية فضلى في درجة الحرارة 70ْم ورقم هيدروجيني 6.

التوصيات Recommendations

1. عزل جراثيم الباسيلوس المنتشرة في البيئة المحلية، ودراسة إمكانات الاستفادة منها وتحسين خصائصها المفيدة، فهي ثروة حقيقية لا تقل قيمتها عن غيرها من الثروات الطبيعية.
2. دراسة إنتاج الألفا أميلاز من العزلة Bacillus licheniformis 2، ومعرفة الظروف الفضلى للإنتاج، وتحديد بقية الشروط الفضلى لعمل الإنزيم.
3. دراسة إنتاج الألفا أميلاز من العزلة Bacillus licheniformis 2 ضمن المخمر.
4. توسيع مجالات استعمال إنزيمات الأميلاز، وتطبيقها في الصناعات النشوية وغيرها للحصول على منتجات أعلى جودةً .

References المراجع

[1] **حمد، ابتسام – علي نظام، عدنان (1998)**. الفيروسات والجراثيم، كلية العلوم، منشورات جامعة دمشق.

[2] **حمد، ابتسام (2005)**. ميكروبيولوجيا الهواء والتربة، كلية العلوم، منشورات جامعة دمشق.

[3] **زهران، أحمد شوقي محمد – بريشة، جابر زايد (2006)**. الإنزيمات الميكروبية وتطبيقاتها في الصناعة و الطب، كلية الزراعة – جامعة إلمنيا، منشورات جامعة الملك سعود.

[4] **سلامة، علي عبد الله – زيد، علي محمد علي (2005)**. التجارب العملية في البكتريا الطبية، قسم النبات والأحياء الدقيقة – كلية العلوم – جامعة الملك سعود.

[5] **علي نظام، عدنان – الأشقر، كمال (2007)**. بيولوجيا الأحياء الدقيقة، كلية العلوم، منشورات جامعة دمشق.

[6] **عمران، عبد الملك (2006)**. إنتاج إنزيم البروتياز القلوي من بكتيريا *Bacillus* واستخدامه في بعض الصناعات الغذائية والكيميائية. أطروحة مقدمة إلى كلية الزراعة ـ جامعة دمشق للحصول على درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الأغذية.

[7] **عمر، عادل علي أحمد (2006)**. إنتاج إنزيمات الأميلاز من الفطريات وتنقيتها واستعمالها في بعض المجالات التطبيقية. أطروحة مقدمة إلى كلية الزراعة- جامعة دمشق للحصول على درجة الدكتوراه في علوم الأغذية.

[8] **Amoa-Awua W. K., Terlabie N. N., Sakyi-Dawson E. (2005).** Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa.International Jornal of Microbiology. 106 p. 343-347.

[9] **Antony V. Samrot, A. Sahaya Vijay M. Phil.. (2009).**α-Amylase Activity Of Wild And Mutant Strains Of Bacillus Sp. The Internet Journal of Microbiology. Volume 6 Number 2.

[10] **Arindam Roy, Bijoy Moktan, Prabir K. Sarkar. (2007)**. Characteristics of Bacillus cereus isolates from legume-based India fermented foods. Food Control. 18 p. 1555-1546.

[11] **Ashraf Muhammad Hamad. (2004)**. Studies on the biosynthesis of alpha amylase by a mutant strain of *Bacillus* species. Department of botany university of the Punjab Lahore, Pakistan.

[12] **Ashie, I. N. (2003).**Bioprocess Engineering of Enzymes. Food Technology Feature. 57(1):p. 44-51.

[13] **Bader J., Neumann B., Schwab K., Popovic M. K., Scheler C., Bajpai R. (2006).** α-amylase production in fed batch cultivation of Bacillus caldolyticus: An interpretation of fermentation course using 2-D gel electrophoresis. vol. 20, no4, pp. 413-420.

[14] **Baudoin E., Benizri E., Guckert A. (2001)**. Metabolic structure of bacterial q`communities from distinct maize rhizosphere compartments. Eur J Soil Biol 37:p.85–93.

[15] **Baudoin E., Benizri E., Guckert A. (2002)**. Impact of growth stages on bacterial community structure along maize roots by metabolic and genetic fingerprinting. Appl Soil Ecol.19:p.135–145.

[16] **Behal A. J., SINGH, M. K. SHARMA, P. PURI AND N. BATRA. (2006).** Characterization of Alkaline α-Amylase from Bacillus sp. AB 04. International Journal of Agriculture & Biology1560–8530/2006/08–1–80–83.

[17] **Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K. H., Schmid, R. D., (2003)**. Directed evolution of a bacterial alpha-amylase: toward enhanced pH-performance and higher specific activity. Protein Sci. 12, 2141–2149.

[18] **Bhoopander Giri, Pham Huong Giang, Rina Kumari, Ram Prasad, Ajit Varma. (2005)**. soil biology, volume 3. India.

[19] **Borneman J., Skroach P. W., O'Sullivan E. W., Palus J. A., Rumjanek N. G., Jansen J. L., Nienhuis J., Triplett E. W. (1996).** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Appl Environ Microbiol 62:p.1935–1943.

[20] **Cappuccino, James G. / Sherman, Natalie. (2001)**. Microbiology a laboratory manual.

[21] **Carlos Alberto Martins Cordeiro, Meire Lelis Leal Martins, Angélica Bárbara Luciano. (2002)**. Production and properties of α-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Braz. J. Microbiol. vol.33 no.1.

[22] **Claus D., Berkeley R. C. W., (1986)**. Genus *Bacillus* Cohn 1972, 174AL. In: Snaeath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1105–1139.

[23] **Clanway C. P. (2002)**. Plant growth Promotion by *Bacillus* and Relatives. [In:] R. Berkeley, M. Heyndriclex, N. Logen, P. De Vos: Applications an Systematic of *Bacillus* and Relatives. Blackwell Publishing, pp. 219-236.

[24] **Colin R. Harwood. 1989**. *Bacillus*. The university of Newcastle upon tyne, U.K..

[25] **Crabb, W. D., Shetty, J. K., 1999**. Commodity scale production of sugars from starches. Curr. Opin. Microbiol. 2, 252–256.

[26] **Crueger W., and Crueger A. (1989)**. Industrial Microbiology pp. 189-218. sinauer Associates , Sunderland. MA.

[27] **Dharani Aiyer P. V. (2004).** Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. African journal of biotechnology vol. 3(10). pp.519-522.

[28] **Duineveld B. M., Kowalchuk G. A., Keijzer A., van Elsas J. D., van Veen J. A. (2001)**. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragment coding for16SrRNA. Appl Environ Microbiol 67:p.172–178.

[29] **Egdell J. W., W. A. Cuthbert, C. A. Scarlett and S. B. Thomas. (1960)**. Some studies of the colony count technique for soil bacteria. J. appl. Ract. 23(I),69-86.

[30] **Eliana de Oliveira Santos, and Meire Lelis Leal Martins. (2000).** Effect of the Medium Composition on Formation of Amylase by Bacillus sp. Brazilian Archivs of Biology and Technology. Vol.46, n. 1 : pp. 129-134.

[31] **Fariha H., Amer A. S., Abdul Hameed. (2006)**. Industrial application of microbial lipases. Enzyme and microbial technology 39. p. 235-251.

[32] **Feitelson J. S., Payne J., Kim L. (1992)**. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond> Bio/Technology 10, 271-275.

[33] **Frost G. M., Moss D. A. (1987)**. Production of enzymes by fermentation. In: Rehm HJ, Reed G, editors. Biotechnology, vol. 7a. Weinheim: Verlag Chemie. P. 65-211.

[34] **Gordon R. E., Haynes W. C., and Pang C. H. (1973)**. The Genus *Bacillus*. Agricultural Hand Book No. 427 : The United States Department of Agricultural, Washington. D.C.

[35] **Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. (2003**). Microbial α-amylases:a biotechnological perspective. *Process Biochem*., 38, 1599-1616.

[36] **Hamilyon L. M., Kelly C. T., Fograty W. M. (1999).** Process Biochem. 35, 27-31.

[37] **He L., Li W., Huang Y., Wang L., Liu Z., Lanoot B.,Vancanneyt . and Swings J. (2005)**. Streptomyces jietaisiensis sp.nov.,isolated from soil in northern china.Int J.Syst. Evol. Microbiol .(55):p.1939-1944.

[38] **Hurst C. J. (2002)**. An introduction to viral taxonomy and the proposal of Akamara, a potential domain for the genomic acellular agents. In:Hurst CJ (ed)Viral ecology. Academic Press, San Diego, pp 41–62.

[39] **Ikram-ul-Haq, Hamad Ashraf, Qadeer M. A., Javed Iqbal. (2005)**. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. Bioresource Technology 96. p.1201-1204.

[40] **Kandra Lili. (2003)**. α-Amylases of medical and industrial importance. Journal of Molecular Structure (Theochem) 666–667 : 487–498.

[41] **Kapoor R., Giri B., Mukerji K. G. (2002)**. Soil factors in relation to distribution and occurrence of vesicular arbuscular mycorrhiza. In: Mukerji KG, Manoharachari C, Chamola BP (eds) Techniques in mycorrhizal studies. Kluwer, Dordrecht, pp 51–85.

[42] **Katarzyna Grata. (2008).** Effect of Urea Phosphate on the *Bacillus sp.* Population soil and antifungal activity of selected Bacillus species on *Fusarium sp.*. Proceedings of ECOpole. Vol.2. p. 315-319.

[43] **Kenneth Todar. (2009)**. Important groups of procaryotes. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Todar's Online Textbook of Bacteriology p. 1:32. www.textbook of bacteriology.net/procaryotes/htm.
www.textbook of bacteriology.net/Bacillus/htm.

[44] **Kim S. B., and Goodfellow M. (2002)**.Streptomyces avermitilis sp.nov.,nom. rev. ataxonomic home for the avermectin-producing streptomycete. Int J,Syst.Evol.Microbiol(52): p. 2011-2014.

[45] **Konsoula Z., Maria L. (2005)**. Co-production of α-amylase and β-galactosidase by *bacillus* subtilis in complex organic substrates.Bioresource Technology 98: p.150-157.

[46] **Lee D., Akao T., Yamashita S., Katayama H., Maeda M., Saitoh H., Mizuki E., Ohba M., (2000)**. Noninsecticidal parpasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity

against human leukemic T cell. Biochemical and Biophysical Research Communication 272, 218-223.

[47] **Lester H., David E. H., George R. S. (1982)**. Effect of mulches on bacterial populations and enzyme activity in soil and vegetable yields. Plant and Soil 64, 193-201.

[48] **Liesack W., Stackebrandt E. (1992)**. Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. J Bacteriol 174:5072–5078.

[49] **Louwrier A. (1998)**.Industrial products: the return to carbohydrate-based industries. Biotechnol ApplBiochem 27:1-8.

[50] **Lowry O. H., Rosebrough N. J., Forr A. C. (1951)**. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Vhem, 193: 265-275.

[51] **Maheshwari R., Bharadwag G., Bhat M. (2000)**.Thermophilic Fungi: physiology and Enzymes.Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(3): p.461-488.

[52] **Mansour T. Abdullah, Nida Y. Ali, Patrice Suleman (2008)**. Biological control of Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary with Trichoderma harzianum and Bacillus amyloliquefaciens. Department of Biological Sciences, Kuwait University. Crop Protection 27: 1354– 1359.

[53] **Marc J. E. C. van der Maarel, Bart van der Veen, Joost C. M. Uitdehaag, Hans Leemhuis, L. Dijkhuizen (2002).** Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. Journal of Biotechnology 94: 137–155.

[54] **Miller G. L. (1959)**. Use of dinitrosalicylic acid regent for determination of reducing sugar analytical. Biochem.(72):348-254.

[55] **Meiying Gao, Rongsen Li, Shunying Dai, Yan Wu, Dan Yi. (2008)**. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. biological control. 44:380-388.

[56] **Mohsen F. N., Dileep D., Deepti D. (2005)**. Purification and characterization of an extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* AX20. Protein Expression and Purification 41.p. 349-354.

[57] **Microbiology procedure**. **(2009)**. www.Microbiologyprocedure.com/microbes-and- lithosphere/Factors-affecting-bacteria-population-in-soil-html

[58] **Murray P. Deutscher (1990)**. Methods in enzymology. Volume 182 Guide to protein purification.

[59] **Nazime Mercan, Atalay Caglar, Belma Aslim, Yavuz Beyatli. (2003)**. Classification of strains of *Bacillus sphaericus* by different statistical methods. Turk J Biol 27: 171-179.

[60] **Novo Nordisk ; A/S .(2004)**.Enzymes at work. Bagsvaerd , Denmark.

[61] **Norris J. R. (1981)**.The genera *Bacillus* and sporolactobacillus ,In the prokaryotes : A hand book on habitats, Isolation and Identification (Starr , M. Stop, H.G.Truper, A.Balows , and Schlehel , H. ed.), Springer-Verlag , Berlin, PP.1711-1742 .

[62] **Okolo B. N., L. I. Ezeogu, and C. N. Mba. (1995)**. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. Journal of Science of food and Agriculture,69, 109-115.

[63] Ole Kirk, Torben Vedel Borchert and Claus Crone Fuglsang (2002). Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, 13:345–351.

[64] Ozlem Kiran, ugur Comlekcioglu, Burhan Arikan (2005). Effect of carbon source and various chemical on the production of a novel Amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* K-12. Turk J Biol. 29 p.:99-103.

[65] Paola Iovieno & Erland Bååth. (2008). Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil.FEMS Microbiology Ecology. 65. p.:400-407.

[66] Pandey A., Nigam P., Soccol C., Singh D., Mohan R. (2000). Advances in microbial amylase. Biotechnol.Appl.Biochem.(31): 135-152.

[67] Paul E. A., Clark F. E. (1989). Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, San Diego.

[68] Prabakaran G., R. Pugalvendhan (2009). Production and immobilization of alpha amylase by using *Bacillus subtillis*. Recent Research in Science and Technology, 1(4): 189–194.

[69] Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (1996). The diversity of the microbial world. In: Prescott LM, Harley JP, Klein DA (eds)Microbiology. WCB Publishers, Dubuque, Iowa.

[70] Priest F. G., (1989).Products and Application. In Biotechnology Handbooks.2-*Bacillus* (Harwood, C.R.ed.), Pleaum press. New York and London. pp 293-320

[71] Priest F. G., (1992). Enzymes extracellular. Vol.2 in Encyclopedia of microbiology, Academic Press. Ins. New York.

[72] Rajan M. (2008). Global market for industrial enzymes. Business communications company, Inc. http://www.bccresearch.com

[73] Rajendra K. S., Kakoli D., Lata A., Preeti N. (2007). Ahighly thermostable and alkaline amylase from B ssp.PN5. Bioresource technology. 98: 260-265.

[74] Riisgaard, S., (1990). The enzyme industry and modern biotechnology. In: Christiansen, C., Munck, L., Villadsen, J. (Eds.), Proceedings of the Fifth European Congress on Biotechnology. Munksgaard, Copenhagen, pp. 31–40.

[75] Saintpierre D., Amir H., Pineau R., Sembiring L., and Goodfellow M. (2003). Streptomyces yatensis sp.nov., a novel bioactiv streptomycete isolated from a new Calidonian ultramafic soil . Antonie van Leeuwenhoek. (83):21-26.

[76] Santiago, M., Linares, L., S´anchez, S., Rodr´ıguez-Sanoja, R., (2005). Functional characteristics of the starch-binding domain of Lactobacillus amylovorus alpha-amylase. Biolog´ıa, Bratislava 60, 111–114.

[77] Saban M. Tanyildizi, Dursun Ozer, Murat Elibol (2007). Production of bacterial α-amylase by b.amyloliquefaciens under solid substrate fermentation. Biochemical Engineering Journal 37: 294-297.

[78] Sekar Sudharhsan, Sivaprakasam Senthilkumar, and Karunasena Ranjith. (2007). Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from pecies of bacillus isolated from spoiled food waste. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (4). pp. 430-435.

[79] Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004). Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Can J Microbiol 50: 1– 17.

[80] Shalstrom, S., Brathen, E., (1997). Effects of enzyme preparations for baking, mixing time and resting time on bread quality and bread staling. Food Chem. 58, 75–80.

[81] **Smith N. R., Gordon R. E., and Clark F. E. (1946).** Aerobic mesophylic spore forming Bacteria. Dep. Agric. Misc. pub No 559, Washinton.

[82] **Sumitra R., A. K. Patel, K. M. Nampoothiri, S. Chandran, G. Szakacs, C.R.Soccol, and A. Pandey (2004).** Alpha amylase from aFungal culture grown on oil Cakes and its properties. Brazilian archives of biology and technology. vol.47.n2:pp.309-317.

[83] **Tate R. L. III (1995)**. Soil microbiology. Wiley, New York.

[84] **Teresa Thiel, (1999)**. Isolation bacillus from soil. Science in the real world: Microbes in action. University of Missouri-St. Louris, USA.

[85] **Thippeswamy S., K. Girigowda and V. H. Mulimani. (2006).** Isolation and identification of α-amylase production *Bacillus* sp. from dhal industry waste. India Journal of Biotechemistry & Biophysics.

[86] **Toure Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A. and Thonart P**. **(2004).** J. Appl. Microbiol., 96, 1151-1160. Vol.43, pp. 295-298.

[87] **Ueda, S., (1989)**. Utilization of soybean as natto, a traditional Japanese food. In:

Maruo, B., Yoshikawa, H. (Eds.), Bacillus subtilis: molecular biology and industrial application. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 143–161.

[88] **Visscher P. T., Vandenede F. P., Schaub B. E. M., van Gemerden H. (1992).** Competition between anoxygenic phototrophic bacteria and colorless sulfur bacteria in amicrobialmat.FEMS Microbial Ecol 101:51–58.

[89] **Vidyalakshmi R., R. Paranthaman and J. Indhumathi**. **(2009)**. Amylase Production on Submerged Fermentation by Bacillus spp. World Journal of Chemistry 4 (1): 89-91.

[90] **Watanab T. (2002)**. Pictorial Atlas of soil and feed fungi,Morphology of ultured fungi and key to Species.Second Edition CRC PressLondon.

[91] **Wieland G., Neumann R., Backhaus H. (2001)**. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizosphere in response to crop species, soil type, and crop development. Appl Environ Microbiol 67:5849–5854.

[92] **Wikipedia (2009).** http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus

[93] **Wiseman A. (1995)**. Introduction to principles. In: Wiseman A, editor. Handbook of enzyme biotechnology. 3rd ed. Padstow, Cornwall, UK:Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd., p. 3-8.

[94] **Zheng Yuguo, Wang Zhao, Chen Xiaolong**. (**2000**). α-Amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. Biochemical Engineering Journal 5. p.115–121.

[95] **Virtual microbiology (2008)**. Chapter1 Microorganisms in the environment.

http://inst.bact.wisc.edu/inst/.

[96] http://starcentral.mbl.edu/microscope/portal.php?pagetitle=classification&BLCHID=44-1022

[97] www.bccresearch.com